



Universidad Autónoma de Madrid

Facultad de Medicina

Departamento de Cirugía

INFLUENCIA DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO y LA PROTEINA P16 EN EL CÁNCER DE LARINGE

**Estudio retrospectivo sobre la presencia del ADN del VPH, la proteína transcripcional
p16 y factores epidemiológicos con posibles influencia sobre la supervivencia
del carcinoma epidermoide de laringe de origen glótico**

Tesis Doctoral 2017

El doctorando

Fdo. Álvaro Sánchez Barrueco

Director de Tesis

Director de Tesis

Fdo. Prof. Carlos Cenjor Español

Fdo. Prof. Carlos Almodóvar Álvarez

RESUMEN de la Tesis Doctoral

“INFLUENCIA DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO y LA PROTEINA P16 EN EL CANCER DE LARINGE. Estudio retrospectivo sobre la presencia del ADN del VPH, la proteína transcripcional p16 y factores epidemiológicos con posibles influencia sobre la supervivencia del carcinoma epidermoide de laringe de origen glótico”

Doctorando Álvaro Sánchez Barrueco, Junio 2017

Antecedentes/Objetivos

El carcinoma epidermoide de laringe (CEL) se relaciona con el consumo de tabaco y alcohol, aunque en los últimos años, el virus del papiloma humano (VPH) ha sido reconocido como un factor etiológico con una tendencia creciente. Existe un número limitado de series que estudien la implicación de este virus sólo en la laringe, diferenciándolo de otras localizaciones anatómicas. En el último metanálisis publicado la prevalencia de VPH alcanzó el 23,6%, siendo el HPV16 el subtipo más común. Sin embargo, la presencia del VPH no demuestra en sí su oncogenicidad. La positividad a la proteína p16 se considera como un marcador de dicha oncogenicidad. Todavía no existe un consenso sobre la influencia del VPH en la supervivencia, por lo que es necesario estudiarlo de manera específica y con un seguimiento prolongado.

Objetivos: Determinar la presencia del VPH y p16 en muestras de CEL, y su relación con la supervivencia y otros factores epidemiológicos.

Material y método

De manera retrospectiva y aleatorizada se estudiaron 123 muestras de CEL, diagnosticadas y tratadas únicamente de manera primaria con cirugía desde 1977 a 2005. Mediante reacción de cadena de la polimerasa se analizó la presencia de ADN viral de VPH y mediante inmunohistoquímica la presencia de la proteína p16.

En base a la historia clínica del paciente se estudiaron factores epidemiológicos, tumorales, quirúrgicos y de consumo de tabaco y alcohol.

Se analizó la supervivencia tanto global como libre de enfermedad, con un largo seguimiento con una mediana de 18,39 años.

Resultados

Nuestra serie aporta una importante potencia estadística a partir de una serie elevada de casos, absolutamente homogénea en patología (carcinoma epidermoide), localización (únicamente laringe), origen (glotis) y tratamiento (solamente cirugía como tratamiento primario); con un seguimiento muy prolongado, mayor de 10 años.

El estudio epidemiológico reveló al tabaco como un factor determinante en la supervivencia global, estableciendo que por cada cigarrillo que el paciente reconocía fumar al día, el riesgo de fallecer incrementaba un 2,86%. Del mismo modo, la edad del paciente resultó un factor determinante en la supervivencia global, confirmando que por cada año de edad al diagnóstico aumentaba un 3,76% la posibilidad de muerte.

En caso de ocurrir una recidiva, el lugar de aparición de la misma resultó determinante en la supervivencia global, de manera que las recidivas ganglionares tenían peores tasas de supervivencia que las locales.

Se constató la presencia del virus del papiloma humano en el carcinoma epidermoide de laringe, con una presencia del 22,76%, pudiéndose establecer su capacidad transcripcional, en base al estudio de la proteína p16, en un 11,38% de las muestras. Fueron encontrados 11 serotipos de virus distintos, siendo los más comunes el VPH16 y el VPH66. Por primera vez se identificaron los serotipos VPH43 y VPH62 en la laringe. No se constató un aumento de la tendencia de infección por VPH a lo largo del tiempo.

La proteína de transcripción p16 se determinó en el 39,02% de las muestras. Supuso un factor determinante en la aparición de recidivas y en su localización, evidenciándose que las muestras p16 positivas presentaron menor número de recidivas. En el caso de darse la recidiva, en las muestras p16 positivas, siempre se dio antes del segundo año de seguimiento, no reportándose ninguna recidiva a partir de entonces.

Por otro lado, la cohorte asignada en base a la positividad al VPH y al p16, se relacionaba significativamente con el tamaño y el estadio tumoral, evidenciando como la negatividad a ambos marcadores asociada tamaños y estadios mayores, mientras que su positividad asociada estadios menores.

La presencia del VPH no tuvo influencia alguna en la supervivencia global o libre de enfermedad. La presencia del p16 no tuvo influencia en la supervivencia global pero se relacionó significativamente con una mejor supervivencia libre de enfermedad con un 76% menos de probabilidad de muerte por año en los p16 positivos. Además, la asociación del p16 con el VPH asoció las cifras mayores de supervivencia libre de enfermedad.

Conclusiones

En nuestra serie el VPH está presente en más del 20% de los carcinomas epidermoides de laringe sin influencia en la supervivencia. Las muestras p16+ presentan una mejor supervivencia libre de enfermedad, con ausencia significativa de recidivas a partir del segundo año de seguimiento.

Es necesario estandarizar como estudios complementarios al VPH y el p16 en el proceso diagnóstico del Carcinoma Epidermoide de laringe, con el objetivo de conocer más sobre dichos tumores y confirmar con series con un mayor número de muestras, que tienen relevancia en la supervivencia.

*“Si no conoces a los demás ni te conoces a ti mismo,
correrás peligro en cada batalla;*

*Si no conoces a los demás, pero te conoces a ti mismo,
perderás una batalla y ganarás otra;*

*Si conoces a los demás y te conoces a ti mismo,
ni en cien batallas correrás peligro”*

Sun Tzu, El Arte de la Guerra, s.IV a.C

A **Elena y Ana** por ser siempre el mayor apoyo, una ayuda infinita y una inspiración. Recorrer la vida con vosotras es el mejor regalo de cada día. Sin vosotras, esto no tendría sentido; y sin vuestra paciencia y comprensión este trabajo no hubiera sido posible.

Agradecimientos

A **mi madre** por enseñarme cómo debe de ser un médico y una mejor persona. A **mi padre y hermanos** por su cariño constante y por ser un ejemplo continuo de superación.

A **Carlos Almodóvar Álvarez** por pasar de jefe a amigo, y por ser el ideólogo de este trabajo y director de esta tesis. A **José Antonio Brandáriz Castelo** por su paciencia infinita, por enseñarme la cara amable de la oncología y por su labor impresionantemente exhaustiva de recogida de datos desde 1977. Sin él todo lo que está escrito hubiera sido impensable. Sé que estarías orgulloso de todo este resultado. A todas las personas del **Servicio de Otorrinolaringología del Hospital Universitario 12 de Octubre**, en especial a **Gisela Risson Pino**, por dejarse siempre embaucar y permitirme robarle tiempo para que me ayudara. A **Claudio Ballestín Carcavilla** por soportar miles de dudas y por luchar contra el VPH, saliendo victorioso. A **Sofía Fernández Hernández**, por lidiar con la inmunohistoquímica del p16 y, aún en la distancia, ayudarme a encontrar unos datos muy interesantes. A **David Lora Pablos**, por responderme a millones de mails; siempre con absoluta disposición y con un trabajo estadístico impecable.

A la **Fundación Mutua Madrileña** por haber apostado por este proyecto y no haber pedido nada a cambio. A **Adela Paredes**, y a la **Sociedad Española de Otorrinolaringología y Cirugía de Cabeza y Cuello**, por estar siempre dispuestos a ayudar a los socios y ser impulsora y albacea de la evolución de la Otorrinolaringología en nuestro país.

A **Carlos Cenjor Español** por ser un jefe que enseña, guía, motiva y permite crecer a todos los que le seguimos, además de director de esta tesis. A **José Miguel Villacampa Aubá** por ser un incansable amigo y crítico, y un eterno compañero de proyectos, además de enseñarse incluso más de la vida que de la medicina. Es una suerte diaria compartir el camino de la Otorrinolaringología con semejantes profesionales y referentes nacionales, además de amigos y portadores de férreos valores personales. A **Fernando González Galán** y **Gonzalo Díaz Tapia**, por ponerle una sonrisa al trabajo diario, por demostrar que el residente siempre supera al adjunto y por darme el empujón final que se necesita para hacer grandes cosas. Al resto de los compañeros y amigos del **Servicio de Otorrinolaringología del Hospital Universitario Fundación Jiménez Díaz**, **Hospital General de Villalba** y **Hospital Universitario Infanta Elena**, por aguantarme cada día y enseñarme a cada minuto.

Los resultados obtenidos en esta tesis doctoral se obtuvieron a partir del trabajo realizado gracias a los fondos obtenidos en la **VII Convocatoria de Ayudas a la investigación de la Fundación Mutua Madrileña**; dentro del trabajo *Estudio de la prevalencia e implicación del Virus del Papiloma Humano en el Carcinoma Epidermoide de cuerda vocal* que se llevó a cabo de 2010 a 2015.

Índice

Abreviaturas.....	3
Estado actual de la materia.....	5
Introducción	5
Cáncer de laringe	7
Anatomía y fisiología de la laringe.....	7
Epidemiología	9
Estados precancerosos	11
Factores predisponentes	12
Clínica y Diagnóstico.....	17
Anatomía patológica	22
Vías de extensión tumoral	23
Clasificación TNM	28
Tratamiento.....	30
Virus del papiloma humano (VPH).....	47
Serotipos de VPH.....	47
Incidencia	49
Fisiopatología	50
Métodos de detección del VPH	54
Relación con el CECyC.....	61
Relación con la laringe.....	73
Tratamiento.....	81
Proteína de transcripción p16	87
p16 y oncogénesis	87
Medición del p16.....	87
En el CECyC.....	89
En el CEL	91
Estudio acerca de la influencia del VPH y la proteína p16 en el carcinoma de laringe.....	93
Justificación del estudio.....	93
Relevancia	93
Hipótesis y objetivos del estudio	101
Hipótesis de trabajo	101
Objetivos	102
Material y métodos	103
Financiación y grupo de trabajo	103
Diseño del estudio	103
Criterios inclusión/exclusión	103
Tamaño muestral	104
Procesamiento de las muestras.....	104
Variables contempladas	105

Análisis estadístico	107
Seguimiento	108
Resultados	109
Epidemiológicos	109
Relacionados con el tumor	112
Relacionados con la cirugía	120
Estudio VPH.....	121
Estudio p16.....	127
Estudio de cohortes.....	131
Supervivencia	134
Tablas de datos: VPH y p16.....	145
Tablas de datos: Cohortes.....	151
<i>Contraste de hipótesis y discusión</i>	<i>157</i>
Contraste de hipótesis	157
Discusión.....	159
<i>Conclusiones.....</i>	<i>165</i>
<i>Publicaciones, premios y presentaciones asociadas al estudio</i>	<i>167</i>
<i>Bibliografía.....</i>	<i>169</i>

ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ARN: Ácido ribonucleico

BCL-XL: Molécula transmembrana mitocondrial que se encarga de transducción de la señal del FAS-L, una de las muchas proteínas anti-apoptóticas de la familia Bcl-2, implicadas en la supervivencia de las células tumorales.

CE: Carcinoma Epidermoide

CECyC: Carcinoma Epidermoide de Cabeza y Cuello

CEL: Carcinoma Epidermoide de Laringe

CEL-G: Carcinoma Epidermoide de Laringe, de origen glótico

CECo: Carcinoma Epidermoide de Cavidad oral

CEOf: Carcinoma Epidermoide de Orofaringe

CHEP: Cricohioidoepiglottopexia

CHP: Cricohioidopexia

CIS: Carcinoma *in situ*

CRT: Cirugía robótica transoral

CTL: Cirugía transoral láser

EEUU: Estados Unidos de América

EGFR: Receptor del factor de crecimiento epidérmico (*Epidermal Grow Factor Receptor*).

FFPE (*Formalin-fixed, paraffin-embedded tissues*): Muestras listas para procesamiento, fijadas con formalina y embebidas en parafina.

H12O: Hospital Universitario 12 de Octubre.

HIS: Hibridación *in situ*.

HR: *Hazard ratio* o Razón de riesgo. En el análisis de supervivencia, es la relación de las tasas de riesgo correspondientes a las condiciones descritas por dos niveles de una variable explicativa.

IC: Intervalo de confianza

IFN: Interferón.

LSC: Laringectomía supracricoidea

LSG: Laringectomía supraglótica

LVP: Laringectomía vertical parcial

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero

NBI: Imagen de banda estrecha (*Narrow band image*)

ORL: Otorrinolaringología

p53: Gen supresor de tumores que se encuentra en el brazo corto del cromosoma 17 (17p13).

pRb (gen y/o proteína): Gen supresor de tumores que se encuentra en el brazo largo del cromosoma 13 (13q14.1-q14.2).

PCR: Reacción de cadena de la polimerasa

PET: Tomografía por emisión de positrones (*positron emission tomography*)

PF: Terapia quimioterápica a base de cisplatino y 5-fluorouracilo.

PLR: Papilomatosis laríngea recurrente

STP: Segundo tumor primario.

QT: Quimioterapia

QT_i: Quimioterapia de inducción

QT-RT: Quimioradioterapia

RM: Resonancia magnética

RR: Riesgo relativo u *Odds Ratio*

RT: Radioterapia

SEORL-CCC: Sociedad Española de Otorrinolaringología y Cirugía de Cabeza y Cuello (www.seorl.net)

SIDA: Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida

SvG: Supervivencia Global

SvLE: Supervivencia Libre de Enfermedad

TC: Tomografía computarizada

TNM (*tumor-node-metastasis*): Clasificación tumoral en función de la afectación tumoral por tamaño (T), afectación ganglionar (N) y metástasis a distancia (M).

TPF: Terapia quimioterápica a base de docetaxel, cisplatino y 5-fluorouracilo.

VCG: Vaciamiento Cervical Ganglionar

VEB: Virus de Epstein-Barr

VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular.

VHS: Virus del Herpes Simple

VIH: Virus de la Inmunodeficiencia Humana

VPH: Virus del Papiloma Humano

VPH-AR: Virus del Papiloma Humano de Alto Riesgo oncogénico.

VPH-BR: Virus del Papiloma Humano de Bajo Riesgo oncogénico.

ESTADO ACTUAL DE LA MATERIA

INTRODUCCIÓN

El carcinoma epidermoide de laringe (CEL) es la vigésima causa de neoplasia maligna en el ser humano, con cifras anuales de más de 151.000 nuevos diagnósticos y 90.000 muertes asociadas, al año, en todo el mundo(1). Englobado dentro de los carcinomas epidermoides de cabeza y cuello (CECyC) alcanzan un impacto económico de 3100 millones de dólares/año, según el *National Cancer Institute* de Estados Unidos de América (EEUU), situándose el CECyC como la décima neoplasia más costosa de tratar(2). A pesar de su alta prevalencia existe una carencia de marcadores específicos considerados como factores pronósticos o que favorezcan la toma de decisiones acerca de su tratamiento.

Al igual que en la mayoría de los CECyC, la oncogénesis del CEL se relaciona con el consumo de tabaco y/o de alcohol. Tras años de concienciación social, el consumo de tabaco está descendiendo notablemente entre la población; pero a pesar de ello, la incidencia de CECyC no ha descendido de la manera que estaba prevista. Con el tiempo la infección por el virus del papiloma humano (VPH) está siendo reconocido como un factor etiológico adicional en el desarrollo de estas neoplasias (3). Por tanto, la epidemiología del CECyC ha ido cambiando, constatándose la disminución de la incidencia del cáncer asociado al tabaco, mientras que el asociado al VPH ha ido en aumento(4), especialmente en casos sin los factores etiológicos clásicos(5, 6). Según el *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) se estima que el VPH es causante de 10752 neoplasias/año en EEUU(7). Este aumento de la prevalencia del VPH se atribuye a un cambio en las conductas sexuales que ha derivado en una aumento de la transmisión del virus en las últimas dos décadas, así como de otros patógenos de transmisión venérea(8, 9). Sin embargo, recientemente estos postulados son discutidos, atribuyendo a una confusión en la recepción de datos de índole sexual(10).

Existen múltiples estudios que analizan la presencia de VPH en diferentes lugares de la cabeza y el cuello, aunque en la mayoría de los casos compartiendo diferentes sublocalizaciones, que presentan unas características bioanatómicas distintas(11). Es por ello, que es necesario disponer de series largas, centradas en una única localización y que diferencien los serotipos de VPH encontrados. Actualmente se dispone de un número limitado de ellas centradas en el CEL(12-25), demostrándose una prevalencia de VPH muy variable, que en recientes metanálisis alcanza el 20-25%(26-30).

Hay más de 130 serotipos de VPH clasificados en grupos de bajo (VPH-BR) o de alto riesgo (VPH-AR) en función de su potencial para la oncogénesis(31), siendo el VPH16 el más comúnmente detectado(14, 15, 22-25, 27). A continuación le sigue el VPH18(14-16, 19, 25-27, 29). En general, se evidencia una alta prevalencia de VPH-AR(32).

La presencia del VPH no implica una oncogénesis como tal, por lo que se han intentado buscar marcadores de transcripción oncogénica, ya sea en forma de ARN mensajero (ARNm)(29, 33, 34) como en forma de sobreexpresión de proteínas de transcripción tumoral(13, 14, 35-41). Entre dichos marcadores proteicos, se encuentra la proteína p16 que es considerada como un marcador específico de la infección por VPH(34, 42-44). Sin embargo, no hay muchas series laríngeas con un número notable de muestras(40, 44-47), por lo que es necesario una muestra amplia, centrada en una localización anatómica, para valorar su influencia en la oncogénesis y en la supervivencia. De hecho, existe una controversia acerca de la influencia de la p16 en la supervivencia, que apunta hacia una mejor

supervivencia global en las muestras p16 +, pero no ha resultado significativa hasta la fecha(40, 45, 48). Por otro lado, solamente se dispone de una serie con un seguimiento mayor de 5 años(44) y con una homogeneidad de tratamiento oncológico, lo que provoca una variabilidad notable en los resultados en lo que respecta a la supervivencia.

Debido a la falta de consenso acerca de estos biomarcadores, actualmente se tratan de igual manera los CECyC asociados o no al VPH, excepto la sublocalización de la orofaringe. Recientemente, en las guías de la *National Comprehensive Cancer Network* (NCCN)(49, 50), se ha establecido un algoritmo de estadificación independiente para el carcinoma epidermoide de orofaringe (CEOf) VPH-AR + y p16 +, distinguiéndolo del cáncer orofaríngeo de otra etiología. Sin embargo, en el CEL todavía es primordial definir cuál es la etiología real, disponer de series largas y homogéneas únicamente de laringe; para poder establecer criterios significativos de estadificación y tratamiento.

En todos los CECyC VPH+ sigue en periodo de estudio la respuesta a tratamientos y la supervivencia asociada. En algunas series parece ser mejor en los VPH+, independientemente del tratamiento aplicado(51-54), mientras que en otras series parece que la respuesta de estos tumores a la quimioterapia (QT) y/o radioterapia (RT) es mejor, *a priori* requiriendo menor dosis que en los tumores asociados a factores clásicos(36, 37, 55). En el CEL, no obstante, todavía existe controversia en si el VPH es un factor oncogénico directo y si supone un factor determinante en la supervivencia. Algunos autores refieren que el virus no tiene importancia pronóstica (16, 19, 24, 32, 56), mientras que otros demuestran tanto una mejor supervivencia global y libre de enfermedad en pacientes con CEL VPH + (25, 57) como en VPH - (58).

En conclusión, la implicación del VPH en el desarrollo de neoplasias humanas está significativamente demostrada. Sin embargo, a pesar de que se conoce el incremento de la transmisión y su implicación *sine qua non* en carcinomas genitales y orofaríngeos, se desconoce su importancia real en los tumores glóticos. La obtención de resultados al respecto podría ser útil para la búsqueda de datos pronósticos predictores de la respuesta tratamiento, actualmente no existentes, además de posibles dianas terapéuticas que disminuyan la morbilidad asociada al CEL. Adicionalmente, con estos resultados podría valorarse, en un futuro, la influencia de la vacunación universal frente al VPH(29) o el efecto terapéutico de dicha vacuna, una vez confirmada la oncogénesis de origen viral.

La extracción de datos respecto al CEL es en muchas ocasiones complicado, debido a que se disponen de pocas series centradas en el CEL y la mayoría de los estudios epidemiológicos y de covariables se centran globalmente en el CECyC. Por ello es interesante plantear un estudio de la presencia del VPH y la proteína p16, con una población homogénea (solamente tratada con cirugía), en una localización anatómica específica (glotis), con diferentes grados de afectación tumoral, con un seguimiento prolongado (al menos de 10 años); relacionando estos datos con factores epidemiológicos susceptibles de resultar significativamente pronósticos o influyentes.

CÁNCER DE LARINGE

Anatomía y fisiología de la laringe

La laringe(59, 60) es una estructura móvil que forma parte de la vía aérea. Se encuentra situada en la porción anterior del cuello, relacionada con los cuerpos vertebrales C3-C6, y mide aproximadamente 5 cm de longitud.

El esqueleto laríngeo está formado por seis tipos de cartílagos (Figura 1): epiglotis, tiroides, aritenoides, corniculados, cuneiformes y cricoides. El cartílago tiroides delimita la laringe anterior y lateralmente, y consiste en dos láminas cuadradas que se fusionan anteriormente en la línea media, en la denominada escotadura tiroidea. El cartílago cricoides tiene forma de anillo de sello y su preservación es esencial para mantener cerrada la vía aérea. La epiglotis tiene una porción unida al cartílago tiroides e al hueso hioides (a través del ligamento tiroepiglótico e hioepiglótico, respectivamente) y una porción libre, en cuyos lados se conforman los pliegues ariepiglóticos. Los cartílagos aritenoides se encuentran superiormente al cartílago cricoides y reciben inserciones de fibras de músculos intrínsecos de la laringe y del ligamento vocal, con influencia directa en la fonación. Los cartílagos corniculados, o de Santorini, y los cuneiformes, o de Wrisberg, están ubicados por encima de los cartílagos aritenoides y a nivel del repliegue ariepiglótico, con función única de dar rigidez a los repliegues ariepiglóticos.

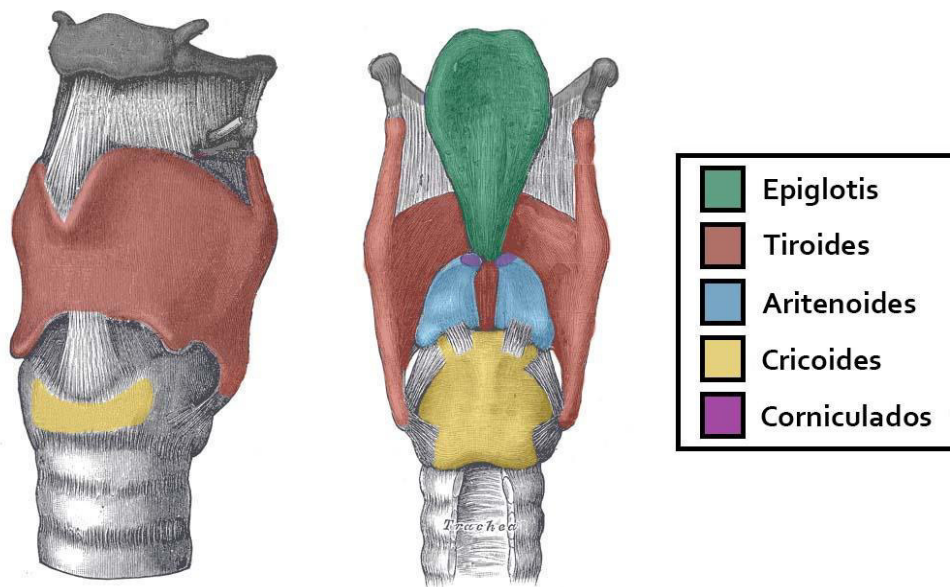


Figura 1. Cartílagos laríngeos¹

Los músculos de la laringe son los responsables de la amplia variedad de movimientos de la misma. Son clasificados en extrínsecos e intrínsecos. La musculatura extrínseca es aquella que se relacionan con los movimientos y fijación de la laringe, e incluyen al grupo muscular depresor de la laringe (esternohioideo, omohioideo, esternotiroideo, digástrico, tirohioideo, esternohioideo, homohioideo) y elevador de la laringe (geniohioideo, digástrico, milohioideo, estilohioideo y

¹ Extraído de <http://teachmeanatomy.info/neck/viscera/larynx/laryngealcartilages/>. Autor: Oliver Jones

constrictores medio e inferior de la faringe). La musculatura intrínseca es aquella responsable del movimiento de las cuerdas vocales, incluyendo a los músculos cricotiroideo, cricoaritenoides posterior y lateral, tiroaritenoides, e interaritenoides.

La laringe está innervada por fibras motoras y sensitivas que provienen de los nervios laríngeo superior e inferior de cada lado, ramas del nervio vago (X par craneal). Ambos pares de nervios conducen impulsos aferentes y eferentes y están conectados entre sí por medio de fibras anastomóticas de asociación. El nervio laríngeo superior es el principal nervio vasomotor, secretor y sensitivo; teniendo una rama externa, motora, que inerva el músculo cricotiroideo y una rama interna que atraviesa la membrana tirohioidea para innervar la mucosa de la laringe y epiglotis. El nervio laríngeo inferior está encargado de la función motora y se separa del vago a diferente nivel en cada lado. En el derecho lo hace a la altura de la arteria subclavia y en el lado izquierdo se separa del vago en el cruce con el cayado aórtico.

La irrigación de la laringe corre a cargo de la arteria laríngea superior (rama de la tiroidea superior, rama de la carótida externa) y la arteria laríngea inferior (rama de la tiroidea inferior, rama del tronco tirocervical de la arteria subclavia). La red capilar linfática de la región supraglótica está más o menos separada de la región infraglótica por la escasez de trama linfática en los bordes de los pliegues vocales.

La laringe presenta dos funciones principales como son la protección de la vía aérea (mediante una función de esfínter o válvula, evita el paso de los elementos deglutidos y cuerpos extraños hacia el tracto respiratorio inferior) y la fonación (mediante la modulación del aire espirado a través del movimiento de las cuerdas vocales). Otras funciones son la respiratoria (permitiendo el paso de aire entre el medio externo y los pulmones) y la deglutoria (favoreciendo el paso del bolo alimenticio al esófago).

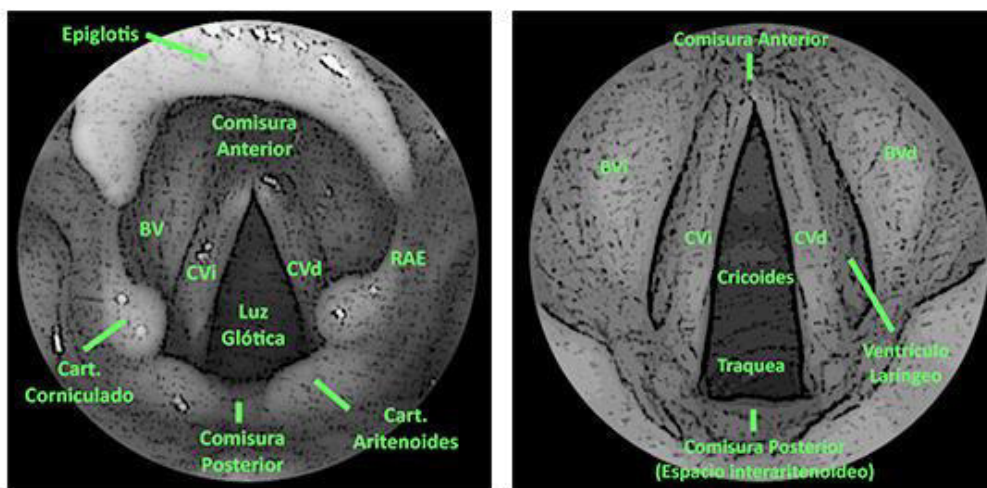


Figura 2. Visión directa de la laringe supraglótica y glótica. BV (banda ventricular), CVD (Cuerda Vocal derecha), CVI (Cuerda Vocal izquierda), RAE (replegue aritenopiglotico)²

Académicamente la laringe está dividida en supraglotis, glotis y subglotis (Figura 2). La supraglotis se extiende desde la superficie lingual de la epiglotis superiormente, hasta el ventrículo laríngeo

² Extraído con permiso de *Atlas de patología otorrinolaringológica y cervicofacial*. Álvaro Sánchez Barrueco. Ed. Glosa, 2011

inferiormente, inmediatamente por encima de las cuerdas vocales. La unión de la base de la lengua y la superficie lingual de la epiglotis se denomina *vallecula*. Los tumores de la base de la lengua pueden invadir esta región y más allá en la laringe supraglótica, lo que también puede hacer que la clasificación anatómica de los orígenes del tumor sea inexacta. La laringe supraglótica está compuesta por la epiglotis suprahioidea (superior a un plano horizontal a través del hueso hioides) o infrahioidea (inferior a dicho plano horizontal), los pliegues ariepiglóticos o aritenopiglóticos, los aritenoides, las bandas ventriculares o cuerdas vocales falsas, y los ventrículos de Morgagni. Ésta permite el paso del bolo alimenticio y el cierre de la vía aérea, a través del colapso del vestíbulo laríngeo por báscula de la epiglotis. Este mecanismo impide el paso del contenido a la vía aérea, con el consecuente riesgo de aspiración. Alteraciones en su función conlleva disfunción de la deglución (disfagia) y de la respiración (disnea).

La **glotis** está compuesta por las cuerdas vocales y las comisuras, anterior y posterior. Las funciones de la glotis incluyen la fonación, la protección y la respiración. La fonación está condicionada al movimiento de las cuerdas vocales, a través de la graduación del movimiento de los cartílagos de la laringe, variando el grado de apertura entre las cuerdas vocales; y una depresión o una elevación de la estructura laríngea. Ello modula el tono de los sonidos producidos por el paso del aire a través de dichas estructuras que, junto a la disposición de los otros elementos de la cavidad oral (labios, lengua y boca) y la conformación de los formantes vocales, permite determinar los diferentes sonidos que son emitidos. La protección de la vía aérea es la función más antigua de la laringe y es vital para la supervivencia, evitando el paso de cualquier contenido a la vía aérea. Para ello utiliza diferentes mecanismos como el cierre glótico, el cese de la respiración y el reflejo de la tos. La respiración es permitida por la abducción de las cuerdas vocales, lo que contribuye al paso del aire y adecuado intercambio gaseoso. Esta función requiere que los aritenoides estén permanentemente abiertos para mantener dilatada la glotis. Las alteraciones en la función glótica provocarán, por tanto, alteraciones en la fonación (disfonía) y en la respiración (disnea).

La **subglotis** es el espacio laríngeo inmediatamente inferior a las cuerdas vocales, con un plano horizontal a través del borde inferior del cartílago cricoides como límite inferior. Su función única es el permitir el paso de aire para la respiración y fonación. Alteraciones en su función provocarán, por tanto, alteraciones en la respiración (disnea).

Epidemiología

El CEL aparece fundamentalmente en varones (88,03%)(61), con un pico de incidencia entre de 45-70 años. Son infrecuentes antes de los 40 años (5%) y excepcionales en los niños, que suelen tratarse de tumores de origen embrionario. Su incidencia aumenta, no obstante, de forma progresiva en los adultos jóvenes y en las mujeres, sobre todo, en las áreas urbanas; probablemente por el efecto residual del tabaquismo, creciente todavía entre los pacientes de sexo femenino(62).

El CEL es más frecuente en la glotis (60-65%) por delante de la supraglotis (30-35%) o de la región subglótica (5%)(50). Debido a que la disfonía es un síntoma temprano, la mayoría del cáncer glótico se diagnostica en etapas tempranas. Por ello, el cáncer glótico (CEL-G) tiene una excelente tasa de curación del 80% al 90%(50), cuando no se ve afectado adversamente por la afectación ganglionar regional.

Estadísticamente, el CEL es la vigésima causa de neoplasia maligna en el ser humano, con cifras anuales de más de 151.000 casos de nuevo diagnóstico y 90.000 muertes asociadas, en todo el mundo(1), con una proyección estimada de 216.349 casos masculinos y 28.655 casos femeninos nuevos en 2030(61). Las tasas de incidencia/mortalidad estandarizadas por edad del CEL entre los hombres fueron 7,9/4,0 por 100.000/año; mientras que en las mujeres alcanzó el 0,9/0,5 por 100.000/año(61). La región con mayor incidencia y mortalidad asociada fue el Caribe, seguido por el sur de Europa y Sudamérica; mientras que la región donde las tasas de mortalidad fueron menores fue África central y occidental(61).

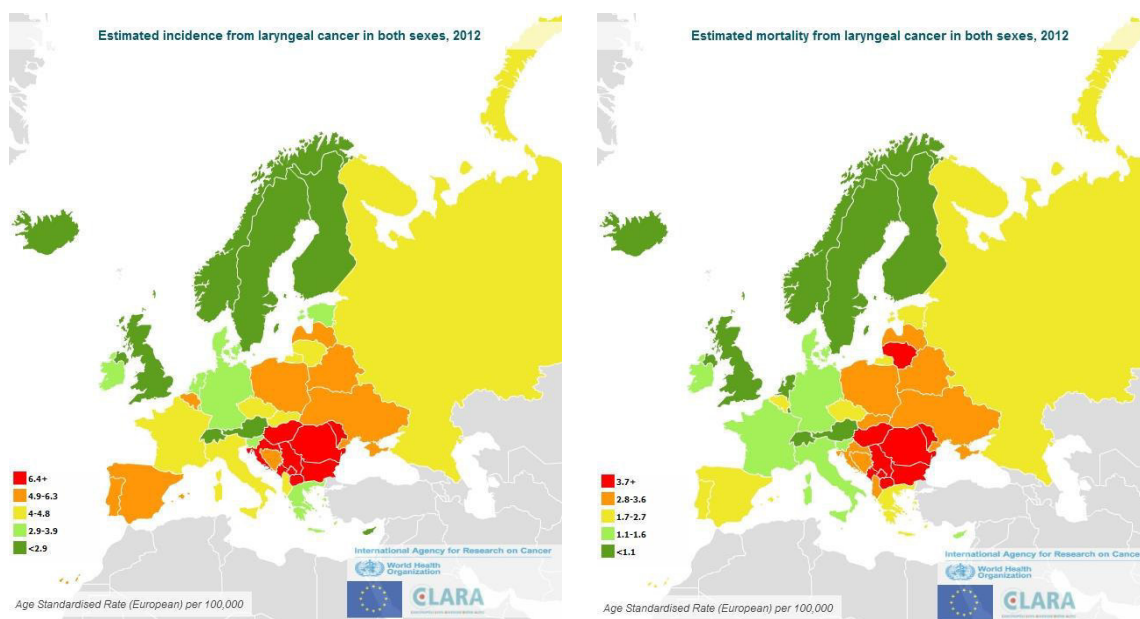


Figura 3. Estudio del CEL en Europa. Incidencia (izquierda) y mortalidad asociada, en ambos sexos³

En Europa, actualmente, según datos de la IARC(63) los países con mayor prevalencia y mortalidad son los de Europa del Este (especialmente los Balcanes), tal y como se puede observar en los gráficos. España presenta una incidencia y mortalidad media alta, estandarizada por edad (Figura 3).

En Europa, las tasas de mortalidad estandarizadas por edad alcanzaron el 4,7/100.000 en 1990-91 y de 2.5/100.000 en 2010-2011(64), evidenciando una tendencia a la disminución de la mortalidad asociada al CEL (Figura 4). En Europa, después de un aumento constante entre los años 1950-1970, la mortalidad por cáncer laríngeo se ha estabilizado desde principios de 1980 en hombres, en la mayoría de los países del oeste y del sur de Europa, y desde principios de los noventa en Europa central y oriental(64). La mortalidad masculina disminuyó de 5,1/100.000 en 1980-81 a 3.3/100.000 en 2000-01(65). Sin embargo, todavía en los años 2000-2010 se evidenciaba una variación de 10-15 veces entre los países que presentaban una mayor mortalidad asociada al CEL, como eran los países de Europa Central y Oriental, Croacia, Hungría y las federaciones rusas (7-8/100.000) frente en los países que menor mortalidad asociada presentaban (<1/100.000) en los países nórdicos, Finlandia, Noruega y

³ Extraída de IARC International Agency for Research on Cancer (IARC) en EUCAN (<http://eco.iarc.fr/eucan>)

Suecia. En 2010-11, los índices de mortalidad masculina más altos se registraron en Hungría, Moldavia y Rumanía ($>6/100.000$) y los más bajos en Finlandia, Noruega, Suecia y Suiza ($<1/100.000$).

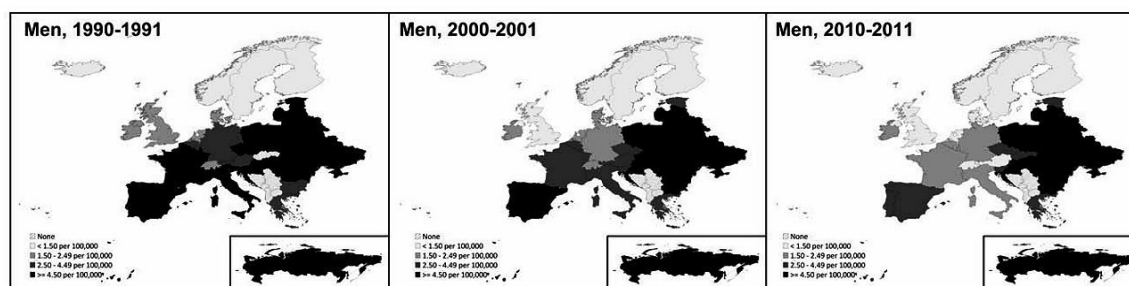


Figura 4. Evolución temporal de la mortalidad asociada al CEL en Europa ⁴

Por tanto, la incidencia del CEL en los hombres ha ido disminuyendo tanto en América del Norte como en Europa Occidental debido a los programas gubernamentales para el abandono del hábito tabaquico, que ayudan a seleccionar de manera cada vez más frecuente a hombres jóvenes que no beben ni fuman(66).

La mortalidad asociada al CEL en mujeres es mucho menor que en hombres(67), con tasas de 0,3/100.000 en Europa, entre 1980 y 2012(65). Ésta se mantuvo estable (0,29/100.000) entre 1980 y 1994; y disminuyó ligeramente a partir de entonces (0,23/100.000 en 2000-01). Sin embargo, la mortalidad en mujeres en España no muestra una tendencia especialmente favorable dado el incremento en el consumo de tabaco de las nuevas generaciones tras 1970, en absoluta contraposición a las bajas tasas femeninas en Ucrania dada la tradición femenina de mínimo consumo de tabaco y alcohol(62).

Por lo tanto, la mortalidad por cáncer laríngeo mostró una tendencia decreciente en las últimas décadas en la mayor parte de Europa, a raíz de los cambios en el consumo de tabaco y, sobre todo en los países mediterráneos, del consumo de alcohol(64). Estos datos son similares a los observados en Estados Unidos, donde las tasas disminuyeron desde principios de los noventa, aunque se ha observado en los últimos años una tendencia a la estabilización(68).

La supervivencia a cinco años del CEL es menor en los países de Europa oriental (alrededor del 40%) que en otros países, especialmente del norte de Europa (más del 60%)(69, 70).

Estados precancerosos

Se enmarcan dentro de las laringitis crónicas, ya sean laringitis blancas (leucoplasias laríngeas, paquidermias blancas y papilomas epidermoides) o rojas. En el plano histológico, sólo se trata de una

⁴ Extraída con permiso editorial de *Chatenoud et al. Laryngeal cancer mortality trends in European countries. Int J Cancer. 2016 Feb 15;138(4):833-42*

alteración del epitelio y de atipias celulares, pero sin ruptura de la membrana basal(71). Previamente a la génesis del CEL, se encuentran diferentes estadios precancerosos o premalignos, que clásicamente se han descrito en tres grados:

- **Grado I:** *Hiperplasias o Hiperqueratosis* con o sin displasia leve
- **Grado II:** *Displasias moderadas*
- **Grado III:** *Displasia severa o Carcinoma in situ (CIS)*

Los estadios premalignos, lamentablemente, pueden ser infradiagnosticados por métodos diagnósticos imprecisos o por falta de experiencia clínica. Además, pueden pasarse por alto las primeras etapas de las lesiones, como la displasia severa o el carcinoma *in situ*, ya que a menudo se presentan como alteraciones de la mucosa de bajo contraste, con rugosidad superficial o enrojecimiento, que rara vez tienen un aspecto claramente maligno(72).

El riesgo de transformación de una lesión precancerosa en un cáncer invasivo es difícil de determinar, aunque parece aumentar un 25% por cada grado aumentado. Se supone que el CIS, en ausencia de tratamiento, evolucionaría a un carcinoma invasivo en más de 66-75% de los casos(72). Se debe tener en cuenta que no hay series amplias que apoyen estas hipótesis y, por otro lado, no todos los cánceres invasivos tienen que estar precedidos de lesiones precancerosas. Es por ello, que en el diseño del estudio no fueron incluidos los CIS dado que, aunque su potencial de malignización es importante, no suponen en sí una verdadera neoplasia.

Factores predisponentes

Existen múltiples factores predisponentes que se asocian a la oncogénesis del CEL, dentro de los cuales el tabaco y el alcohol son los más estudiados. Sin embargo, en la actualidad existen numerosos factores cuya implicación en dicha oncogénesis está todavía en entredicho.

Tabaco

El factor esencial de la oncogénesis del CEL es, sin duda, el tabaco; a menudo asociado a un consumo excesivo de bebidas alcohólicas. Los efectos cancerígenos del tabaco pueden deberse a diferentes hechos(73):

- *Formación de una quemadura crónica:* parece ser más evidente en los cánceres orofaríngeos que en los laríngeos, dado que la temperatura del humo inhalado desciende rápidamente en las vías aerodigestivas altas.
- *Efecto irritativo local:* por componentes del humo como los fenoles y aldehídos, que provocan una inflamación crónica.
- *Cancerígenos demostrados:* hidrocarburos aromáticos policíclicos y nitrosaminas.

La relación entre el tabaco y el CEL está demostrado(74), alcanzando una razón de riesgo (RR) del 3,43 para los fumadores(73). La exposición al tabaco provoca una secuencia de cambios moleculares que conllevan alteraciones del ADN celular, a través de mutaciones en el gen p53 y p16, que finalizan en una pérdida del control del ciclo celular(75). El tabaquismo pasivo se mostró como un riesgo oncogénico tanto en el domicilio como en el trabajo, teniendo una RR de 1,60 si la exposición es mayor a 15 años(76). El consumo de >20 cigarrillos/día es un factor de riesgo muy importante para el cáncer de cavidad oral, faringe y laringe(73). En el caso del tabaco de mascar, especialmente consumido en India, se considera un factor importante en el desarrollo de cáncer de hipofaringe y laringe en pacientes nunca fumadores(77).

El impacto del cese del hábito tabáquico alrededor reduce drásticamente el riesgo de desarrollo de cáncer de vías aerodigestivas hasta alrededor del 90% si se produce a la edad de 30 años o del 50% si se da a los 50 años(78). De hecho, la tendencia mundial a la disminución del consumo de tabaco ya provoca la evidencia de una menor incidencia y mortalidad asociada al CEL(64).

Alcohol

El papel del alcohol es más difícil de precisar aunque se ha relacionado con un aumento de la razón de riesgo de padecer CEL(79, 80). El principal compuesto, el etanol, no es cancerígeno por sí mismo. Podría actuar en los microsomas hepáticos y comprometer el metabolismo de los agentes verdaderamente cancerígenos, como los del tabaco; de ahí la sospecha de que actúen como cofactores sinérgicos. Por otro lado, existen algunas sustancias que podrían ser cancerígenas como los *ésteres de forbol* (alcoholes anisados), *hidrocarburos aromáticos policíclicos* (algunos tipos de whisky) y *nitrosaminas* (algunos tipos de cerveza). El alcohol, por tanto, tiene tres efectos perjudiciales basados en la irritación local, como disolvente de agentes cancerígenos del tabaco y como inhibidor de la producción de la proteína p53, con función protectora celular(79).

Aunque generalmente se le ha atribuido como cofactor del tabaco, Hashibe(79) demostró que el alcohol es un factor de riesgo independiente en el desarrollo de CECyC, evidenciando que un elevado consumo se relaciona con CEOF, CEL y carcinomas de hipofaringe, en población nunca fumadora (RR 2,04 en bebedores de ≥ 3 bebidas/día). Deberá dirimirse, en un futuro, si dicha estadística es atribuible a otras causas como el VPH, no contemplado en el dicho estudio(79).

Exposición laboral

La asociación de factores laborales y el CEL sigue siendo difícil de demostrar, por la elevada incidencia de fumadores y alcohólicos crónicos entre los pacientes estudiados. Sin embargo se describen varias asociaciones como el ácido sulfúrico, asbesto, líquidos de corte utilizados en la fabricación de piezas de metal, formaldehído, polvos textiles y carbonilla. Varios estudios han sugerido una asociación entre el CEL y la exposición ocupacional a agentes como gas mostaza(81), níquel(82), productos de caucho(83), formaldehído(84) y aceite mineral(85), aunque el nivel de evidencia fue poco concluyente.

Marchand(86) llevó a cabo un estudio de casos y controles en Francia entre 1989 y 1991 relacionando la exposición al amianto o fibras vitrificadas (lana mineral, materiales refractarios de cerámica, filamentos de vidrio y microfibras) con 315 casos de CEL y 305 controles; sin encontrar una relación significativa con el desarrollo de CEL.

En el estudio de Shangina(87) se estudió la relación entre al menos 73 sustancias sospechosas de ser carcinogénicas en 316 casos de CEL; comparándola con 728 controles. La historia ocupacional fue valorada de manera ciega encontrando que existía un RR significativamente elevado para la aparición de CEL en pacientes expuestos profesionalmente al polvo de carbón (RR = 1.81), polvo de aleaciones duras (RR = 2,23) y disolvente clorados (RR = 2,18), sin encontrar una relación dosis dependiente. Sugirieron una posible relación con exposiciones elevadas a formaldehído. No se encontró asociación alguna en cuanto a la exposición al asbesto o a vahos de ácido inorgánico.

Boffetta(88) llevó a cabo un estudio multicéntrico de casos y controles basado en población a principios de los años ochenta, en seis zonas del sur de Europa. El análisis incluyó 1010 casos masculinos de CEL y de carcinoma de hipofaringe; frente a 2176 controles. Encontraron evidencia de un riesgo mayor de CEL para los trabajadores de industrias de la construcción, metal, textiles, cerámica y alimentos, y en el transporte ferroviario; además de aquellos que trabajan en la industria maderera, previamente no descrita. Sin embargo no estratificaba los resultados en hipofaringe o laringe, sino que aglutinaba todos los resultados; sin poder extraer conclusiones de manera unitaria para la laringe.

Factores genéticos

Dentro de factores genéticos que puedan estar relacionados con la oncogénesis laríngea se describen a la anemia ferropénica, anemia de Fanconi, síndrome de Werner, síndrome de Lynch, síndrome de Li Fraumeni(89). Parece ser que estos desordenes genéticos conllevan a una susceptibilidad especial a sustancias cancerígenas laríngeas, debido a alteraciones enzimáticas. Entre estas, parece que la arilhidrocarburo hidroxilasa, que al encontrarse disminuida conlleva una mayor exposición del cancerígeno al material genético.

Situación socioeconómica

En EEUU, la relación entre un estatus social y el cáncer de cavidad oral (CECo) demuestra una RR mayor en los pacientes de clase social baja y nivel de educación pobre(90). En Dinamarca un estudio similar, que incluía carcinomas orales, faríngeos y laríngeos, concluyó que el riesgo de cáncer fue mayor en pacientes con situación socioeconómica baja; teniendo, sin embargo, los inmigrantes mejor supervivencia que los propios daneses(91). En otros estudios relacionan de manera significativa el nivel de educación de los pacientes con el estadio del CEL al diagnóstico, revelando que aquellas personas con niveles educativos más bajos alcanzaban el diagnóstico más tardíamente, presentando estadios más avanzados(92). Del mismo modo, aquellos hombres que vivían solos presentaban, al diagnóstico, un estadio más avanzada de su CECyC(92).

Factores nutricionales

Existe una evidencia consistente de que el bajo consumo de frutas y verduras(93, 94) se asocia con alto riesgo de carcinogénesis de laringe e hipofaringe, después del ajuste para el consumo de alcohol y tabaco(95). Este factor parece ser uno de los influyentes, a parte del consumo de tabaco y alcohol, en la variabilidad de mortalidad por CEL en Europa, provocando una disminución de la mortalidad en los países de Europa occidental mayor que los de la oriental, con economías menos comerciales(96).

Higiene dental y pérdida de piezas dentarias

La cavidad oral es el enlace entre el medio ambiente y el tracto gastrointestinal y respiratorio. La pérdida de dientes generalmente se asocia a infecciones bacterianas crónicas, que parecen tener un papel muy importante en la patogénesis del cáncer. Algunos estudios confirman como la enfermedad periodontal (revelada en forma de boca séptica y/o pérdida de piezas dentarias) y la ausencia de higiene bucal pueden ser causas independientes de cáncer de cabeza, cuello y esófago.

De este modo, la pérdida de piezas dentarias se ha relacionado con una RR de 1,68 ($p=0,055$) con tumores de cabeza y cuello(97). La higiene dental pobre, de igual manera, se relaciona con la génesis de CECyC con una OR 1,89-2,89 ($p= 0,03$)(98).

Inmunodepresión e infecciones víricas

La inmunosupresión implica una incapacidad para controlar las mutaciones que conllevan un descontrol del ciclo celular y de las infecciones por virus, lo parece derivar en una mayor incidencia de cánceres(99).

En países con elevados recursos se ha demostrado un aumento de la incidencia de cánceres asociados a trasplante de órganos sólidos(100) o diálisis prolongadas(99). Ya es conocido que la mayoría de estos cánceres son causados por virus(100, 101) como:

- Sarcoma de Kaposi (virus del herpes humano 8)
- Linfoma no Hodgkin (virus del herpes humano 8 y virus de Epstein-Barr[VEB])
- Linfoma Hodgkin (VEB)
- Hepatocarcinoma (Virus de la hepatitis C y B)
- Carcinoma genitales: cuello uterino, vulva, vagina, pene y ano (VPH)
- Carcinoma de orofaringe (VPH)
- Carcinomas gastrointestinales (VPH)(102)

Otras formas de tumores favorecidos por la inmunodepresión son los cutáneos. Los pacientes con antecedentes de trasplante de órgano sólido tienen 65-100 veces más probabilidad de manifestar un carcinoma de células escamosas(103), 2-16 veces un carcinoma basocelular(104) y 8-10 veces un carcinoma de células de Merkel(105); en comparación con la población general.

La infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) asociando el desarrollo de un Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA), está relacionado con el desarrollo del sarcoma de Kaposi y el linfoma no Hodgkin; de manera significativamente más frecuente que en individuos no infectados por el VIH(106). Algunos autores explican la relación del VIH con la oncogénesis a partir de la disminución de los CD4(107), mientras que otros lo relacionan con la inmunosupresión provocada por los tratamiento antiretrovirales que se introdujeron en EEUU en 1996, provocando una inmunocompetencia mejorada y a una menor mortalidad relacionada con el SIDA. A pesar de recientes cambios en el tratamiento, cada vez más específicos y con menos efectos secundarios, la inmunosupresión sigue siendo un factor de riesgo importante(108). Recientes estudios revelan que hay una evidente relación entre el VIH y el riesgo de presentación de neoplasias, con influencia en la supervivencia asociada al cáncer(109). Los pacientes infectados por VIH presentan enfermedades neoplásicas más avanzadas que los VIH negativos con cáncer. Revisando dichos estudios se observa cómo, en efecto, este hecho era plausible en el CEL, observando mayor incidencia de cáncer y una menor supervivencia asociada, con un *Hazard Ratio* o Razón de riesgo (RR) de 1,62, en la población VIH +(109). Otros estudios relacionan un aumento de los tumores VPH + en pacientes con VIH(107).

Datos sexuales

La incidencia general del CECyC ha ido disminuyendo en las últimas décadas mientras que, por el contrario, los CECyC VPH + han ido aumentando(110). Este hecho se ha intentado explicar por un cambio en el comportamiento sexual de la población, que conlleva un aumento de la persistencia del VPH(107). La vía sexual supone una puerta de entrada de numerosos gérmenes, algunos de los cuales comienzan a ser relacionados con la oncogénesis de los CECyC dado que el carácter oncogénico del VPH está absolutamente establecido en el carcinoma genital, admitiéndose su transmisión por vía sexual. Sin embargo, aunque el modo de transmisión del VPH oncogénico a la orofaringe es probablemente también sexual, los datos de la transmisión oral-genital son limitado(111).

A pesar de que la información sexual supone una barrera social y no están protocolizada en la consulta habitual de Otorrinolaringología (ORL); Dahstrom(112) encontró una relación significativa entre el número de parejas sexuales y la realización de sexo oral-genital, con el desarrollo de CEOf. Los pacientes con CEOf tuvieron, en promedio, un número mayor de parejas sexuales a lo largo de su vida. Además el número de parejas a lo largo de la vida incrementaba el riesgo de contraer un CEOf ($p<0,01$). De este modo, aquellos pacientes que reconocían 2-4 parejas presentaban un RR 14,7, los que reconocían de 5 a 9 parejas un RR de 19,1; y aquellos con más de 9 pareja sexuales en su vida, presentaban un RR 34,2. Sin embargo, en un reciente metanálisis se postula que dicha asociación entre el comportamiento sexual y el CECyC podría atribuirse a lo confuso de los hábitos sociodemográficos y de comportamiento sexual, más que a un efecto etiológico del VPH(10).

Por otro lado, la edad parece ser un factor que favorece la transmisión del VPH. De hecho, Smith(113) postula que los pacientes más jóvenes (<55 años), con 4 o más parejas sexuales eran 4,4

veces más propensos a tener VPH-AR al igual que los pacientes de edad avanzada (>55 años) con 3 o menos parejas sexuales. Por otra parte, Schwartz(114) encontró que los pacientes con CECyC y/o CEOF con 15 o más parejas sexuales fueron 2,5 veces más propensos a tener tumores de VPH16 +.

Otros estudios comenzaron a relacionar la presencia de carcinomas genitales con la génesis del CECyC, evidenciando una mayor presencia de CECyC en individuos con historia de cánceres anogenitales asociados a VPH o en maridos de mujeres con cánceres cervicales *in situ* o invasivos(115).

Teniendo en cuenta, por tanto, lo postulado por algunos autores, la información de índole sexual constituye una información que, pese a lo embarazoso que resulta para el médico y para el paciente, puede resultar muy interesante y suponer un dato más a la hora de la toma de decisiones sobre el tratamiento a prescribir y el seguimiento a realizar. Lamentablemente, en la actualidad, no se dispone de estudios que relacionen la información de índole sexual con el CEL ni protocolos de qué datos preguntar.

Clínica y Diagnóstico

Los signos clínicos clásicos que evocan un cáncer de laringe son la disfonía, la disfagia y la disnea. El cáncer de diagnóstico más precoz es el de cuerda vocal. En él la disfonía, cuando es persistente, lleva al paciente a consultar antes, por lo que se presentan al diagnóstico volúmenes tumoral menor y consecuentemente, mejores tasas de supervivencia. Por el contrario, los cánceres supraglóticos y, en especial, los de la zona marginal laríngea, presentan un diagnóstico más tardío (y comúnmente asociado a metástasis regional ganglionar). Los síntomas antes descritos se pueden acompañar de signos clínicos como tos irritativa y, en ocasiones, esputos hemoptoicos que obligan a una exploración ORL exhaustiva.

Una exploración clínica exhaustiva debe incluir siempre una anamnesis completa y una exploración de la cavidad oral, faringe y laringe; además de una evaluación pormenorizada de todas las cadenas ganglionares cervicales. Se debe evaluar el tamaño de la lesión, las estructuras comprometidas y la movilidad de las cuerdas vocales y aritenoides.

La exploración de las cadenas cervicales se realiza con palpación directa estudiando datos sugestivos de malignidad como son la presencia de adenopatías >1,5 cm, conglomerados adenopáticos o empastamientos cervicales, adenopatías no dolorosas, inmóviles o fijas a planos circundantes; generalmente con una evolución subaguda. Dicha exploración no debe obviar las glándulas salivales mayores y la inspección del cuero cabelludo, cuyos tumores metastatizan de igual manera a las cadenas ganglionares cervicales.

Endoscopia laríngea



Figura 5. Fibroscopia laríngea de una glotis con un pólipo laríngeo benigno en cuerda vocal derecha (izquierda) y mediante laringoscopia directa de un CEL de comisura anterior (derecha)

La laringe es fácilmente accesible a la exploración debido al desarrollo de técnicas de laringoscopia indirecta(116). En los últimos años se ha generalizado el uso de laringoscopios rígidos y/o flexibles. El más comúnmente utilizado es el laringoscopio flexible o nasofibroscopio, que consiste un endoscopio flexible que se introduce a través de la narina del paciente, avanzando a través de la fosa nasal. Ello permite la valoración *in situ* de la narina, fosa nasal, cavum o nasofaringe, base de la lengua, supraglotis, glotis, subglotis, faringe e hipofaringe (Figura 5). Su uso está ampliamente generalizado, disminuyendo la utilización de la laringoscopia indirecta. Sus posibilidades de grabación permiten un control evolutivo objetivo y una herramienta para la discusión en comités clínico-oncológicos. Siempre se deben tener en cuenta dos excepciones que pueden no ser evaluables con las exploraciones clásicas simples, como son los tumores paraglóticos y los que asientan en el ventrículo de Morgagni, que habitualmente presentan exploraciones anodinas hasta fases muy evolucionadas.

Actualmente la laringoscopia combinada con la biopsia es el diagnóstico estándar en el manejo de las lesiones premalignas y malignas de la laringe(72). El estudio debe complementarse con una adecuada exploración de las cadenas cervicales ganglionares mediante palpación directa.

Estroboscopia

La estroboscopia es considerada una parte importante del diagnóstico de pacientes con displasia laríngea. No obstante, debemos señalar que no existe una correlación estricta entre un patrón vibratorio vocal y un cierto tipo de lesión. Hoy en día, debido a los múltiples y complejos factores relacionados con el sistema vibratorio, la aplicación clínica real a través de mediciones estroboscópicas objetivas aún no se ha logrado(72). Algunos autores postulan que permite establecer un diagnóstico precoz al detectar alteraciones del movimiento de la onda mucosa de las cuerdas vocales, permitiéndonos el diagnóstico precoz de lesiones incipientes a este nivel(117).

Imagen de banda estrecha



Figura 6. Contraste de imágenes con luz blanca (a la izquierda de cada subgrupo) y con imagen de banda estrecha, NBI (a la derecha de cada grupo). El grupo de la izquierda corresponde a un carcinoma de células escamosas invasivas. La luz blanca reveló una lesión exofítica mientras que el NBI resaltó los lazos capilares papilares intraepiteliales, con puntos oscuros gruesos. El grupo de la derecha corresponde a una displasia leve bilateral, donde la luz blanca reveló una extensión superficial bilateral de la queratina mientras que el NBI realzó la queratina en contraste con la vascularización irregular de la mucosa⁵.

En los últimos años, la Imagen de banda estrecha (*Narrow Band Image*, NBI) ha adquirido relevancia como apoyo diagnóstico, formando parte de los llamados endoscopios biológicos. La NBI utiliza picos de absorción de hemoglobina, lo cual permite observar cambios en la microvascularización de las lesiones o «biopsia óptica», que si bien no reemplaza al estudio histopatológico, disminuye el número de biopsias y minimiza el número de falsos negativos(118). El patrón más característico sugestivo de lesiones neoplásicas se define por la presencia de un área con puntos oscuros gruesos y dispersos, en el contexto de una mucosa de apariencia normal (Figura 6). Los estudios de correlación con los hallazgos histopatológicos en base a patrones de angiogénesis, en CEL, establecen una sensibilidad del 61-91% y una especificidad del 87-92%(119, 120); con valor predictivo positivo del 91% y un valor predictivo negativo del 92%(118).

Ecografía

La ecografía se considera como el primer método de imagen utilizado para detectar metástasis de ganglios linfáticos cervicales(121), pero raramente se ha utilizado como técnica de imagen para investigar la laringe. Estudios previos en la literatura han dado resultados prometedores con la ecografía de alta frecuencia en el diagnóstico de la laringe(122). Kraft estableció una serie de puntos de referencia anatómicos para el desarrollo de la endosonografía laríngea con el fin de permitir una correcta interpretación de las imágenes ecográficas de sus estructuras y su capacidad para visualizar regiones críticas como el espacio preepiglótico y paraglótico endoscópicamente(123). De esta manera la endosonografía de la laringe produce imágenes de cortes horizontales comparables con tomografía axial computarizada (CAT) o resonancia magnética (MRI), pero con mayor resolución(124). Sin embargo, aunque prometedor, el uso de la ecografía en la estadificación tumoral es aún muy limitado.

⁵ Extraído con permiso de Laryngoscope y del autor, de Shoffel-Havakuk H. et al. Does narrow band imaging improve preoperative detection of glottic malignancy? A matched comparison study. Laryngoscope. 2016

Tomografía computarizada y Resonancia Magnética

La función de la tomografía computarizada (TC) y resonancia magnética (RM) es valiosísima para la estadificación del CEL y esto tiene una influencia directa en la planificación del tratamiento(72). Ambas pruebas diagnósticas son utilizadas generalmente para complementar la microlaringoscopia (MLS). Idealmente, la imagen debe ser capaz de describir el tamaño del tumor, la extensión exacta, el cruce de la línea media y la infiltración del cartílago, o estructuras extralaringeas.

A parte de la confirmación de la presencia de la tumoración, dichas pruebas ayudan a describir si las lesiones clínicas laríngeas presentan una extensión más profunda y si ésta afecta a las principales estructuras laríngeas. Esta extensión cobra especial importancia en:

- Relación con el **complejo ventricular**: Para definir el tumor como supraglótico, glótico o subglótico, debe determinarse la afectación del complejo ventricular, que incluye la cuerda vocal, el ventrículo de Morgagni y las bandas ventriculares. Estos puntos de referencia son esencialmente mucosos y, por lo general, pueden evaluarse endoscópicamente. Sin embargo, a veces un tumor muy voluminoso puede ocultar su adecuada visualización.
- Afectación de los **espacios submucosos (preepiglóticos y paraglóticos)**. Permite predecir e identificar patrones de propagación tumoral, que tienen un impacto crítico en las decisiones terapéuticas. La participación submucosa de dichos espacios es difícil de evaluar clínicamente y endoscópicamente; mientras que la TC y RM poseen una precisión del 88-93% en la evaluación de la extensión tumoral a dichos espacios(125).
- **Extensión anterior y posterior**. Además de definir la extensión craneocaudal es particularmente importante en el nivel de la glotis, donde su extensión anterior es relativamente frecuente. Cuando el tumor es dependiente de la comisura anterior asocia frecuentemente la afectación del cartílago tiroides en la base de la epiglotis. Este cartílago es propenso a ser infiltrado por el tumor y recientes estudio han demostrado que la TC presenta una sensibilidad adecuada para detectar dicha invasión(126), aunque habitualmente sobreestimada, dando lugar a laringectomías totales innecesarias(127).

La TC es el método de imagen preferido para la estadificación del cáncer laríngeo e hipofaríngeo. Las imágenes se obtienen con el paciente en decúbito supino y durante la respiración tranquila (no en apnea). Puede ser útil realizar un examen adicional en fonación (para una mejor evaluación del ventrículo laríngeo, comisura anterior y pliegues ariepiglóticos) o en Valsalva modificado, para la mejor evaluación de la región retrocricoidea(127). La TC proporciona una imagen más clara de las estructuras óseas y de las calcificaciones que la RM. Además, es menos costoso, más rápido y menos susceptible a los artefactos por movimiento.

La RM permite la realización de diferentes secuencias pero es mucho más susceptible al movimiento. Se utiliza con mayor frecuencia si hay incertidumbre en el compromiso del cartílago, cuando esto es vital para la toma de decisiones terapéuticas. También puede definir mejor el margen entre el tumor y el músculo tiroaritenodeo, y la participación de la base de la lengua.

Tomografía por emisión de positrones

La tomografía por emisión de positrones (PET) consiste en la realización de una TC tras la administración de flúor-18-fluorodeoxiglucosa. Ésta juega un papel cada vez más importante en la evaluación del CECyC, tanto para el estadio primario como para el tratamiento postterapéutico(128). La PET es una modalidad de imagen funcional que evalúa el estado metabólico de los tumores, demostrando ser superior a la TC y RM para diferenciar la recurrencia de los efectos post-radiación o tejido cicatricial en pacientes con CEL(128). Una PET negativa excluye la recurrencia con una certeza alta(72). Debido a su alto coste, su uso se recomienda en caso de resultados inciertos de CT y RM (tumores avanzados con necesidad de descartar enfermedad metastásica a distancia o tumores de origen desconocido)(50), para completar la estadificación del cuello o en caso de sospecha de recurrencia posradioterapia(72).

Biopsia

Ante cualquier sospecha de tumoración laríngea o cervical, ya sea por visión directa o por sospecha radiológica, debe complementarse con una toma de biopsia que confirme la sospecha neoplásica y aporte una caracterización, fundamental para el planteamiento terapéutico.

Las biopsias laríngeas pueden realizarse en la consulta a través del acceso que aporta la laringoscopia flexible (a través de un canal de trabajo por donde se introduce una pinza de biopsia) o con una pinza de biopsia transoral con ayuda de la laringoscopia rígida. Dado que esta maniobra es difícilmente tolerada por la mayoría de los pacientes, suele realizarse habitualmente en quirófano, bajo anestesia general. Con el paciente en decúbito supino, mediante la introducción de un tubo de Kleinsasser se alcanza la laringe y se exploran las características y demarcaciones de la tumoración. Con una pinza de biopsia se procede a la toma de la misma, que generalmente aporta mayor cantidad que la realizada en consulta, además de poder manejar posibles hemorragias intraoperatorias.

La afectación ganglionar puede no tener un origen claro, en cuyo caso se denomina *tumoración de origen desconocido*. En aquellos casos o en los tumores de origen hematológico, es fundamental la toma de biopsia del ganglio. Ésta puede realizarse mediante una punción aspiración aguja fina (PAAF) o mediante adenectomía completa, a través de una cervicotomía. La rentabilidad PAAF es elevada para los tumores de estirpe no linfoproliferativa(129) pero no es completa en los tumores de estirpe linfoproliferativa. Por tanto, salvo excepciones, la PAAF es una prueba de alta rentabilidad diagnóstica y bajo coste, poco agresiva y con escasas complicaciones con un alto grado de aceptación por el paciente, que puede evitar cirugía en casos de afección benigna y ayuda a la planificación terapéutica en caso de afección maligna(130). No obstante, se estima que en un 5-10% de los casos el material será insuficiente, inadecuado o no permitirá el diagnóstico(131), en cuyo caso será necesario la realización de la adenectomía.

Anatomía patológica

El **carcinoma epidermoide** representa alrededor del 95% de todos los tumores malignos laríngeos(117). La diferenciación del carcinoma epidermoide está aceptada en grados, en función de la similitud del tejido tumoral al epitelio escamoso normal(132):

- **Bien diferenciado:** presencia de perlas córneas
- **Moderadamente diferenciado:** queratinizaciones en células aisladas (sin formar perlas córneas), denominada disqueratosis.
- **Pobrememente diferenciado:** no existe queratinización, pero se aprecian puentes intercelulares (espinas intercelulares).
- **Microinvasivo o microinfiltrante:** aquel que no sobrepase los 3 milímetros de espesor.

El **carcinoma verrucoso** se presenta como un papiloma de amplia implantación que tiende a extenderse de forma local y destruir las estructuras adyacentes. Comprende el 1-3,4% de los carcinomas laríngeos y es mucho más frecuente en varones (13,8 : 1), con una edad promedio de 58,7 años(133). No originan metástasis a distancia, salvo que se transformen en carcinoma epidermoide. Se considera un tumor poco radiosensible y con posible potencial de malignización tras radioterapia, por lo que su principal indicación terapéutica es la quirúrgica(133).

Los **tumores no epiteliales de laringe** son muy infrecuentes, disponiendo de series muy limitadas(134). Generalmente asocian tumores como los sarcomas, linfomas, melanomas malignos y tumores hematológicos, como el plasmocitoma; siendo el más frecuente el condrosarcoma(134, 135).

El **carcinoma basaloide** es una variante rara, que supone el 5% de todos los CEs. Se diagnostica a partir de los criterios de Wain (palidez periférica, asociación con el carcinoma epidermoide, alta relación citoplasmática nuclear, alta tasa mitótica y crecimiento sólido), posee positividad para la tinción anti-34BE12 y CK 5/6 y tiene una ausencia de marcadores neuroendocrinos. Es frecuentemente considerado un carcinoma de alto grado, con peor pronóstico que otros CE, debido a una mayor tasa de metástasis a distancia.

El **carcinoma de células fusiformes** asocia células epiteliales malignas y células mesenquimales. Se sitúa con más frecuencia a nivel glótico. Posee, al contrario que los anteriores, un elevado riesgo de metástasis a distancia.

Otros tumores malignos, como los glandulares, son infrecuentes. Los **adenocarcinomas laríngeos** representan menos del 2% de todos los tumores malignos de laringe. Los **carcinomas adenoides quísticos** y los **mucoepidermoides** son excepcionales.

Vías de extensión tumoral

La laringe fue clásicamente dividida en tres localizaciones que posteriormente demostraron tener patrones de extensión, supervivencia y respuesta terapéutica diferentes. Como anteriormente se ha descrito la laringe se subdivide en supraglotis (epiglotis, repliegue ariepiglótico, bandas ventriculares y ventrículo de Morgagni), glotis (cuerdas vocales, comisuras anterior y posterior, aritenoides) y subglotis (espacio inferior a las cuerdas vocales).

Extensión local

La extensión local es dependiente del origen primario del tumor. Los tumores de origen subglótico tienen mayor tendencia a la extensión paratraqueal y mediastínica, con un aciago pronóstico. Los tumores supraglóticos frecuentemente tienen extensión faríngea, con implicación de la base de la lengua y las paredes faríngeas.

Es de interés destacar las posibilidades de extensión del tumor de origen glótico dado que es el origen de este estudio. Debe tenerse en cuenta que el cartílago tiroides es propenso a la invasión porque su pericondrio interno es deficiente y el pericondrio externo notablemente delgado. A pesar de que el pericondrio actúa como una barrera resistente a la invasión tumoral(125), se ha demostrado que la invasión del cartílago ocurre principalmente cuando la unión de los haces de colágeno interrumpe la barrera pericondrial (por ejemplo, en inserciones ligamentosas). A medida que las células cancerosas se multiplican, separan dichos haces de colágeno, formando pasarelas lineales a través del pericondrio. De este modo, los sitios de unión de las membranas más fuertes, tales como el tendón de la comisura anterior, son, paradójicamente, lugares que facilitan la invasión y extensión extralaringea. El cartílago no osificado es resistente a la infiltración tumoral debido a su capacidad para liberar proteínas que inhiben el factor angiogénico tumoral y las colagenasas(136).

El ventrículo de Morgagni es una zona crítica siempre a tener en cuenta. Causante de un retraso en el diagnóstico de neoplasias alojadas en el mismo, supone la vía de propagación tumoral a los espacios paraglóticos (Figura 7) e, incluso preepiglóticos (Figura 8). Ello conlleva un aumento del estadio tumoral con una consecuente disminución de la supervivencia asociada. La participación de dichos espacios es difícil de evaluar clínicamente y endoscópicamente, por lo que, como anteriormente se ha detalla, las pruebas de imagen son fundamentales para la evaluación de su afectación(105).

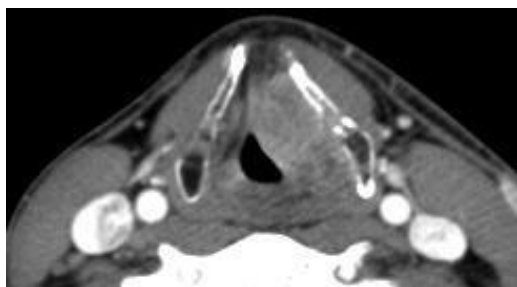


Figura 7. Neoplasia de CVI con extensión paraglótica (rT3Nx) en CT con contraste.

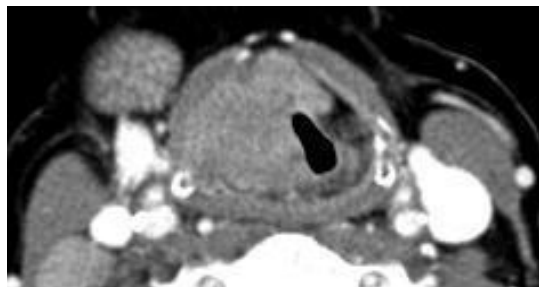


Figura 8. Neoplasia de CVD con invasión de banda ventricular a través del espacio paraglótico e invasión preepiglótica y extralaringea (rT4aNx) en CT con contraste

Los tumores glóticos también pueden extenderse desde la comisura anterior hasta una localización extralaringea caudal al cartílago tiroideo (a través de la membrana cricotiroides), superiormente a través del ventrículo de Morgagni y/o las bandas ventriculares, y provocar una afectación supraglótica; o inferiormente a la subglotis.

Extensión linfática

La red linfática que drena a la laringe se puede dividir de igual manera que la división topográfica (supraglótica, glótica y subglótica). Las diferentes cadenas ganglionares cervicales se agrupan en niveles, que ayudan a la clasificación de afectación ganglionar tumoral, según la *American Joint Committee on Cancer*(137) (Figura 9):

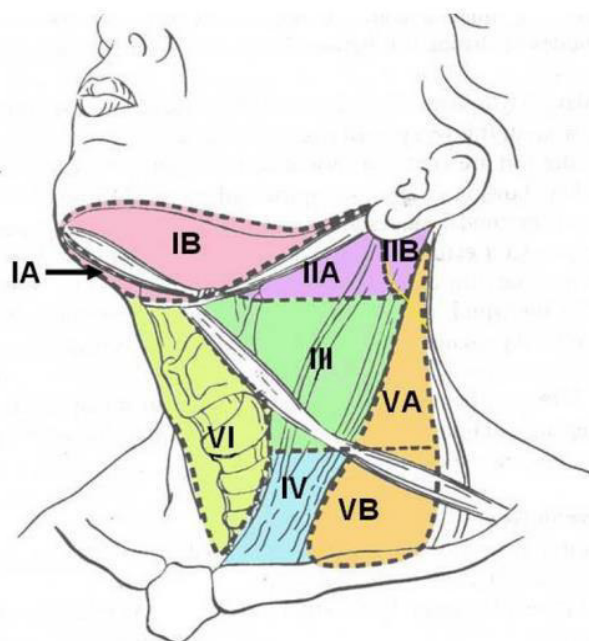


Figura 9. Grupos o Niveles ganglionares cervicales, establecidos por la AJCC⁶

- **Nivel I:** Ganglios linfáticos dentro del límite del triángulo entre vientre anterior del músculo digástrico y el hueso hioides. Estos ganglios pueden verse afectados por neoplasias de suelo de boca, de lengua anterior, cresta alveolar anterior y labio inferior.
 - IA: submentonianos
 - IB: submandibulares
- **Nivel II:** cadena ganglionar cervical anterior. Ganglios linfáticos de la cadena yugular interna desde la base craneal hasta el nivel del hueso hioides. Estos ganglios pueden verse afectados

⁶ Extraído con permiso del autor de Harish, K. *Neck dissections: radical to conservative*. World Journal of Surgical Oncology 2005, 3:21

por neoplasias de cavidad oral, fosas nasales, nasofaringe, orofaringe, hipofaringe, laringe y glándula parótida.

- IIA: ganglios anteriores, mediales o laterales a la vena yugular interna.
- IIB: ganglios posteriores a la vena yugular interna.
- **Nivel III:** ganglios de la cadena yugular interna entre el hueso hioides y el cartílago cricoides. Estos ganglios pueden verse afectados por neoplasias de cavidad oral, nasofaringe, orofaringe, hipofaringe y laringe.
- **Nivel IV:** ganglios de la cadena yugular interna entre el cartílago cricoides y la clavícula. Estos ganglios pueden verse afectados por neoplasias de hipofaringe, tiroides, esófago cervical y laringe.
- **Nivel V:** ganglios de la cadena espinal accesoria posteriores al músculo esternocleidomastoideo. Estos ganglios pueden verse afectados por neoplasias de nasofaringe, orofaringe y cutáneos, del cuero cabelludo y piel cervical.
 - VA: Desde la base craneal hasta el borde inferior del cartílago cricoides. Incluye los ganglios espinales accesorios.
 - VB: Desde el borde inferior del cartílago cricoides hasta la clavícula. Incluye los ganglios cervicales dependientes de las venas cervicales transversas y los ganglios supraclaviculares, a excepción del ganglio de Virchow, que pertenece al nivel IV.
- **Nivel VI:** ganglios del compartimento visceral desde el hueso hioides por arriba hasta la escotadura supraesternal por debajo. A cada lado, el borde lateral está constituido por el borde medial de la adventicia carótidea. Incluye los ganglios pretraqueales, paratraqueales, precricoideo o prelaríngeo (o de *Delphian*), y peritiroideos. Estos ganglios pueden verse afectados por neoplasias tiroideas, glóticas, subglóticas, del seno piriforme y del esófago cervical.
- **Nivel VII:** ganglios del mediastino superior (pretraqueales, paratraqueales y esofágicos). Estos ganglios pueden verse afectados por los cánceres tiroideos o esofágicos.

La **red supraglótica** es una red profusa que drena cadenas yugulocarotídeas, desde el nivel ganglionar digástrico hasta el nivel suprahomohioideo; ello implica, generalmente, el tratamiento sistemático de las áreas ganglionares cervicales derechas e izquierdas. Por tanto, clínicamente habrá que tratar las cadenas IIA, IIB, III, IV, VA, VB, VI. Más del 50% de los pacientes con primarios supraglóticos presentan una diseminación a ganglios regionales debido su ya descrita abundante red linfática que cruza la línea media. Por ello, la presencia de adenopatías bilaterales no es infrecuente en neoplasias primarias supraglóticas, incluso, en etapas tempranas.

Es ampliamente conocido que no existe una **red linfática glótica**; por tanto, mientras la lesión se limite a esta región no es necesario tratar las áreas ganglionares de manera sistemática. Debe tenerse en cuenta la excepción del ganglio prelaríngeo que puede estar afectado en el caso de infiltración tumoral de la comisura vocal anterior, en cuyo caso habrá que tratar las cadenas ganglionares anteriormente descritas, al igual que si el tumor afecta a otra localización de la laringe no glótica.

Por último, la **red linfática subglótica** drena a las cadenas ganglionares recurrentes derecha e izquierda, y yugulares internas. Por tanto, al igual que en los tumores supraglóticos, clínicamente habrá que tratar las cadenas IIA, IIB, III, IV, VA, VB, VI.

En la series revisadas, la afectación ganglionar en los CEL alcanza el 15-45% de los casos(138, 139). Ésta influye negativamente en la supervivencia(138, 140) y parece que de manera proporcional al grado de afectación ganglionar(50, 141, 142). Por ello, el estudio de las metástasis ganglionares es fundamental para el estadiaje del tumor. Parece que tumores con localización marginal, son más susceptibles de presentar metástasis regionales; por lo que debe insistirse en un adecuado estudio radiológico que describa adecuadamente los márgenes del tumor. Por otro lado, acorde con la anatomía la localización del tumor primario dentro de la laringe influye directamente en el índice de metástasis regionales, siendo más frecuentes en los tumores de origen supraglótico(138, 139, 143). Además, la aparición de metástasis regionales ganglionares suele ser pareja al tamaño del tumor en la laringe(138).

Extensión a distancia

Además del riesgo de evolución locoregional, los cánceres de las vías aerodigestivas superiores (VADS) asocian a menudo otras localizaciones oncológicas, sobre todo desarrolladas en las mucosas que se han expuesto a las mismas agresiones. Estas mucosas son habitualmente la orofaringe, el esófago y el pulmón, entre otras.

Las metástasis viscerales, en ausencia de grandes series de autopsias, son infrecuentes por la preponderancia antes descrita de este tipo de tumores a la extensión linfática. Las metástasis descritas más frecuentes en orden descendente son el pulmón, hueso e hígado(144). De hecho, las guías clínicas de diagnóstico y tratamiento más actualizadas, recomiendan la realización de estudios pulmonares de rutina (radiografía de tórax o TC de tórax) en pacientes con enfermedad laríngea neoplásica confirmada(50), para descartar la presencia de segundos tumores primarios o posibles metástasis pulmonares.

En el caso de las metástasis cerebrales, son especialmente poco frecuentes en la evolución de los CECyC(145). Además de por invasión directa, la metástasis cerebral de un CECyC puede ocurrir también por invasión perineural o por vía hematógena. La primera metástasis de este tipo fue descrita por Neumann en 1862(146), refrendándose la teoría perineural por Shattock(147) en 1921. Desde entonces numerosos autores han descrito la invasión de pares craneales y su consecuente invasión craneal. En la serie de Bulut(148), en 2014, se describió una incidencia de 5,7% de metástasis cerebrales de CECyC, en una serie de 11 pacientes (7 de orofaringe, 2 de cavidad oral y dos de hipofaringe), ninguno de ellos como origen la laringe. En el 45,45% de ellos se confirmó la presencia de VPH16, y una positividad marcada a la proteína de transcripción p16. En la serie de Ruzevick(145) se analizaron 39 metástasis, 7 de las cuales fueron de cabeza y cuello (3 de base de lengua, 2 de amígdala palatina y 1 de laringe). El estudio del VPH y el p16 reveló que el 100% de las metástasis con origen en la base de lengua eran VPH + y p16 +; que el 50% (n=1) de las de origen en la amígdala palatina eran VPH+ y p16 +; y la única muestra con origen en la laringe fue negativa para VPH y p16.

Según algún autores, puede relacionarse la presencia de metástasis a distancia con el tamaño y/o estadio tumoral, siendo más frecuentes en aquellos estadios avanzados(145, 148). Un mayor estadio

conlleva una mayor masa crítica tumoral y una evolución más prolongada, que permita la siembra hematológica y/o neural.

Dos estudios recientes(145, 149) apoyan aún más la conclusión de que aunque los pacientes con CECyC relacionada con el VPH tienen una alta probabilidad para el control locorregional y la cura, pero tienen un mayor riesgo de metástasis a distancia. Sin embargo, todos ellos, nuevamente se centran solamente en la orofaringe y/o hipofaringe. De esta manera, observan diferencias en los intervalos entre el diagnóstico del tumor primario y el diagnóstico de la extensión intracraneal, siendo mayores en las cohortes positivas para VPH(145, 148, 149) recomendando alargar el seguimiento en los tumores VPH +. Por otro lado, así como cada vez existen más datos que muestran mejores resultados oncológicos en pacientes VPH + tratados con quimiorradioterapia (QT-RT), a su vez ello puede contribuir al aumento del desarrollo de metástasis a distancia(148).

Segundos tumores primarios

La definición de segundo tumor primario (STP) está fundamentada por los criterios de Warren, postulados en 1932(150) aún vigente en la actualidad:

- Confirmación histológica tanto del tumor primario como el STP.
- Excluirse la posibilidad de tratarse de una metástasis
- Debe existir al menos 2 cm de mucosa normal entre ambos tumores
- Si los tumores se sitúan en la misma localización debe darse un lapso de tiempo mínimo entre ambos de al menos 5 años

Según el momento de la aparición respecto al tumor primario se definen como **metacrónicos** (>6 meses), **sincrónicos** (<6 meses) o **simultáneos** (diagnosticados al mismo tiempo).

El riesgo de desarrollar un STP es superior en los fumadores y bebedores activos que en los que no han fumado o bebido nunca. Los exfumadores y exbebedores presentan un riesgo intermedio. El riesgo de STP parece que se incrementa en aquellos pacientes que siguen fumando y bebiendo después del tratamiento del tumor primario, algo que sugiere el efecto del alcohol y el tabaco en su desarrollo(151). Los pacientes con tumores vinculados al VPH son responsables de la menor incidencia actual de STPs en hipofaringe y orofaringe, antes muy frecuentes(152).

Por otro lado, la edad al diagnóstico parece ser un factor predisponente para padecer un STP, en donde los pacientes con edad inferior a 56 años al diagnóstico presentaban una mayor incidencia de STPs que pacientes con edad más avanzada (> 75 años)(153).

El desarrollo de STP es la causa principal de muerte a largo plazo en pacientes con CECyC, muy por encima de las muertes debidas a metástasis a distancia(153), con un riesgo relativo notablemente mayor que la población general en el mismo rango de edad(154).

Clasificación TNM

La forma de estadiaje TNM (*tumor-node-metastasis*) fue descrita en primera ocasión por Pierre Denoix(155) en 1940. Esta clasificación clásicamente implicaba la extensión local o tamaño tumoral (T), el compromiso de ganglios locales o *regional lymphatic nodes* (N) y las metástasis a distancia (M); sin tener en cuenta factores como el grado histológico de malignidad, la etiología del proceso, la presencia de marcadores virales, la positividad a determinadas proteínas de transcripción (p16, p53, ki-67, etc.) o, incluso, la respuesta del tumor a una terapéutica concreta. Es decir, meramente suponía una clasificación topográfica, que aún hoy en día se lleva a cabo, en primera instancia, de manera clínica (cTNM), complementándose de manera radiológica (rTNM) y confirmándose con los resultados anatomopatológicos (TNM definitivo).

En su última actualización, de 2017(49), la *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) junto a la *Union for International Cancer Control* (UICC), crean un algoritmo de estadificación independiente para el CEOf asociado a VPH de alto riesgo oncogénico (VPH-AR), con p16 +; distinguiéndolo del cáncer orofaríngeo de otra etiología. Por otro lado, a parte de la extensión extracapsular en la afectación ganglionar, la presencia del p16 y del ARN del VEB son datos importantes a tener en cuenta. Por tanto, tanto el VPH como la p16 comienzan, con los años, a tenerse en cuenta en las clasificaciones internacionales de los tumores de cabeza y cuello. Anteriormente no se habían tenido en cuenta dichos factores (VPH y p16) y, probablemente, en futuras revisiones afecten a otras sublocalizaciones de la cabeza y cuello, como la laringe.

Dado que el estudio está centrado en el carcinoma laríngeo de origen glótico se desarrollará la clasificación TNM solamente de esa sublocalización, a partir de la clasificación de la *American Joint Committee on Cancer*(137):

Tamaño (T)

T0	No evidencia de tumor primario
Tis	Carcinoma <i>in situ</i> .
T1	Tumor limitado a las cuerdas vocales, pudiendo afectar a comisuras anterior y/o posterior, sin afectación de la movilidad.
T1a	Limitado a una cuerda vocal
T1b	Limitado a ambas cuerdas vocales
T2	Tumor que se extiende a supraglotis y/o subglotis, o con la movilidad de cuerda vocal afectada.
T3	Limitado a laringe, con fijación de cuerda vocal y/o invasión del espacio paraglótico o la cara interna del cartílago tiroides.
T4a	Enfermedad local moderadamente avanzada Invasión de la cara externa del cartílago tiroides y/o invasión de los tejidos extralaríngeos (tráquea y/o tejidos blandos del cuello incluyendo los músculos profundos de la lengua, musculatura infrahiodea, glándula tiroides o esófago)
T4b	Enfermedad local muy avanzada Invasión de espacio prevertebral o de estructuras mediastínicas, o compromiso de la arteria carótida

Afectación ganglionar regional (N)

N0	Ausencia de ganglios regionales afectados
N1	Ganglio positivo ipsilateral ≤ 3 cm
N2A	Ganglio ipsilateral ≥ 3 cm y < 6 cm
N2B	Ganglios ipsilaterales múltiples < 6 cm.
N2C	Ganglios bilaterales o contralaterales < 6 cm.
N3	Ganglio positivo > 6 cm

Metástasis a distancia (M)

M0	Ausencia de metástasis a distancia
M1	Presencia de metástasis a distancia

Estadio

En función de los ítems anteriormente mencionados (T, N y M) la *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) reagrupa las neoplasias de cabeza y cuello en estadios, independientemente de la localización(156). Lógicamente, un mayor estadio conlleva una menor supervivencia y respuesta a tratamiento.

Estadio 0	Tis	N0	M0
Estadio I	T1	N0	M0
Estadio II	T2	N0	M0
Estadio III	T3	N0	M0
	T1	N1	M0
	T2	N1	M0
	T3	N1	M0
Estadio IVA	T4a	N0	M0
	T4a	N1	M0
	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N2	M0
	T4a	N2	M0
Estadio IVB	T4b	Cualquier N	M0
	Cualquier T	N3	M0
Estadio IVC	Cualquier T	Cualquier N	M1

Como anteriormente se ha descrito, los avances respecto a características virales o proteínicas de los tumores solamente se han contemplado hasta la fecha en el CEO(49), no así en el de otras sublocalizaciones, como la laringe. Por ello, en la actualidad sea probablemente una clasificación insuficiente.

Tratamiento

En las últimas décadas se ha evidenciado un cambio en el manejo del CEL, con un especial incremento de los regímenes que combinan el tratamiento con quimioterapia (QT) y radioterapia (RT), en detrimento de las opciones quirúrgicas(157, 158).

Tras la publicación del estudio sobre CEL del *Department of Veterans Affairs*(157) se correlaciona una expansión del uso de la quimioradioterapia, así como de la radioterapia sola, como tratamiento para el CEL en EEUU, que asocia pareja una menor supervivencia(158). De hecho, los datos del *National Center for Health Statistics* revelan que comparando dos periodos de tiempo, 1983–1985 y 1992–1999, de los 24 cánceres revisados, todos mejoraron su supervivencia a 5 años, excepto el CEL, que disminuyó de 68,1 a 64,7%(159). Esto parecía debido a que las pautas de tratamiento inicial en este mismo período indicaban un incremento en el uso de la QT-RT con una disminución del uso de la cirugía, a pesar de aumentar el uso de las resecciones endoscópicas. El descenso más notable en la supervivencia relativa a los 5 años se dio entre los tumores de glotis en estadio avanzado, estadios iniciales del cáncer supraglótico, y los tumores supraglóticos clasificado como T3N0M0(158); al parecer en relación a una preponderancia de tratamiento no quirúrgico o cirugías menos agresivas. Es decir, en un principio, la opción organopreservativa conllevó un descenso de la supervivencia.

Este cambio en el tratamiento inicial se refleja en las directrices actuales para el tratamiento del cáncer laríngeo(50), donde para estadio iniciales con enfermedad limitada (T1 y T2, o T3 susceptibles) las guías recomiendan por igual la cirugía de conservación de órgano, o el tratamiento único con radioterapia. Para tumores T3 equipara los resultados ya sea con tratamiento mediante QT-RT (el preferido) o cirugía o QT de inducción. En el caso de tumores T4, el tratamiento sólo es mediante cirugía; salvo que el paciente se niegue a la misma, en cuyo caso se recomiendan QT-RT o QT de inducción. Por tanto, salvo en estadios muy avanzados (T4) hay una indicación de evitar la cirugía y, por tanto, conservar el órgano; por lo que se denomina a este hecho *protocolos de conservación de órgano o preservación funcional de la laringe*.

Esquemas de tratamiento

La elección de la modalidad de tratamiento depende del resultado funcional anticipado, los deseos del paciente, la fiabilidad del seguimiento y las condiciones médicas generales del paciente. El tratamiento adyuvante depende de la presencia (o ausencia) de características adversas. Actualmente se siguen, en general, las guías del NCCN(50) y el carcinoma epidermoide de laringe de origen glótico

(CEL-G) es tratado en función del estadio TNM de la *American Joint Committee on Cancer*(137). A continuación se enumeran los tratamientos establecidos por el NCCN en función del grado de afectación TNM(50):

Carcinoma In Situ:

- **Cirugía** (preferible): resección tumoral endoscópica (láser o directa)
- **Radioterapia** (RT): Dosis entre 60,75 Gy (2,25 Gy/sesión) y 66 Gy (2,0 Gy/sesión)

T1 y T2, o algunos T3, susceptibles a protocolo de conservación de órgano:

- **Cirugía:** Laringectomía parcial (abierta o resección endoscópica, si procede) y vaciamiento cervical ganglionar (VCG), si procede.

Si hubiera alguna complicación como:

- Afectación extracapsular ganglionar: QT (Cisplatino) + RT (70 Gy a 2.0 Gy/sesión, en los de alto riesgo; y 44-50 Gy a 2,0 Gy/sesión o 54-63 Gy a 1,6-1.8 Gy/sesión en los de bajo riesgo).
- Márgenes de resección comprometidos, una de las dos opciones siguientes:
 - Cirugía: Reintervención para asegurar márgenes de resección libres.
 - RT: 70 Gy a 2.0 Gy/sesión, en los de alto riesgo; y 44-50 Gy a 2,0 Gy/sesión o 54-63 Gy a 1,6-1.8 Gy/sesión en los de bajo riesgo

- **Radioterapia**

- T1, N0: Dosis entre 63 Gy (2,25 Gy/sesión) y 66 Gy (2,0 Gy/sesión)
- T2, N0: Dosis entre 65,25 Gy (2,25 Gy/sesión) y 70 Gy (2,0 Gy/sesión)
- T2, N1:
 - *Tumores de alto riesgo:* Infiltración local y ganglionar confirmada. Fraccionamiento en diferentes modalidades: 66 Gy (2,2 Gy/sesión) y 70 Gy (2,0 Gy/sesión) diariamente, lunes a viernes, durante 6-7 semanas; o 66-70 Gy (2,0 Gy/sesión) a 6 sesiones/semana; o RT acelerada concomitante con 72 Gy durante 6 semanas (1,8 Gy/sesión, con campo grande, 1,5 Gy como segunda sesión diaria durante los últimos 12 días de tratamiento; o hiperfraccionamiento con 79,2-81,6 Gy en 7 semanas, a razón de 1,2 Gy/sesión, dos veces al día.
 - *Tumores de bajo a medio riesgo:* En sospechas de infiltración. Dosis entre 44-50 Gy (2,0 Gy/sesión) o 54-63 Gy (1,6-1,8 Gy/sesión).

T3 susceptible a Laringectomía Total (N0,N1):

- **Cirugía:** Laringectomía total (N0) o Laringectomía total con VCG ipsilateral o bilateral.

Si hubiera alguna complicación como la afectación extracapsular ganglionar o márgenes de resección comprometidos: QT sistémica (altas dosis de cisplatino, cetuximab, carboplatino + 5-FU en infusión, 5-FU + hidroxyurea, cisplatino + paclitaxel, cisplatino + 5-FU en infusión, carboplatino + paclitaxel, o cisplatino 40 mg/m² semanal) + RT coadyuvante (70 Gy a 2.0 Gy/sesión, en los de alto riesgo; y 44-50 Gy a 2,0 Gy/sesión o 54-63 Gy a 1,6-1.8 Gy/sesión en los de bajo riesgo)
 - **QT + RT concomitante:** Quimioterapia (a elegir entre altas dosis de cisplatino, cetuximab, carboplatino + 5-FU en infusión, 5-FU + hidroxyurea, cisplatino + paclitaxel, cisplatino + 5-FU en infusión, carboplatino + paclitaxel, o cisplatino 40 mg/m² semanal) + Radioterapia en función del riesgo:
 - *Tumores de alto riesgo:* Infiltración local y ganglionar confirmada. Fraccionamiento en diferentes modalidades: 66 Gy (2,2 Gy/sesión) y 70 Gy (2,0 Gy/sesión) diariamente, lunes a viernes, durante 6-7 semanas; o 66-70 Gy (2,0 Gy/sesión) a 6 sesiones/semana; o RT acelerada concomitante con 72 Gy durante 6 semanas (1,8 Gy/sesión, con campo grande, 1,5 Gy como segunda sesión diaria durante los últimos 12 días de tratamiento; o hiperfraccionamiento con 79,2-81,6 Gy en 7 semanas, a razón de 1,2 Gy/sesión, dos veces al día.
 - *Tumores de bajo a medio riesgo:* Sospecha de infiltración. Dosis entre 44-50 Gy (2,0 Gy/sesión) o 54-63 Gy (1,6-1,8 Gy/sesión).
- En caso de presencia tumor residual ganglionar o la sospecha de enfermedad ganglionar persistente, se procederá a realizar un VGC.
- **RT únicamente:** Si el paciente no es susceptible de tratamiento quimioterápico sistémico, siguiendo los mismos principios de RT que en el caso de la QT-RT concomitante.

T3 susceptible a Laringectomía Total (N2, N3):

- **Cirugía:** Laringectomía total (N0) o Laringectomía total con VCG central, ipsilateral o bilateral.

Si hubiera alguna complicación como la afectación extracapsular ganglionar o márgenes de resección comprometidos: QT sistémica (altas dosis de cisplatino, cetuximab, carboplatino + 5-FU en infusión, 5-FU + hidroxyurea, cisplatino + paclitaxel, cisplatino + 5-FU en infusión, carboplatino + paclitaxel, o cisplatino 40 mg/m² semanal) + RT coadyuvante (70 Gy a 2.0 Gy/sesión, en los de alto riesgo; y 44-50 Gy a 2,0 Gy/sesión o 54-63 Gy a 1,6-1.8 Gy/sesión en los de bajo riesgo)
- **QT + RT concomitante:** Quimioterapia (a elegir entre altas dosis de cisplatino, cetuximab, carboplatino + 5-FU en infusión, 5-FU + hidroxyurea, cisplatino + paclitaxel, cisplatino + 5-FU en infusión, carboplatino + paclitaxel, o cisplatino 40 mg/m² semanal) + Radioterapia en función del riesgo:
 - *Tumores de alto riesgo:* Infiltración local y ganglionar confirmada. Fraccionamiento en diferentes modalidades: 66 Gy (2,2 Gy/sesión) y 70 Gy (2,0 Gy/sesión) diariamente, lunes a viernes, durante 6-7 semanas; o 66-70 Gy (2,0 Gy/sesión) a 6 sesiones/semana; o RT acelerada

concomitante con 72 Gy durante 6 semanas (1,8 Gy/sesión, con campo grande, 1,5 Gy como segunda sesión diaria durante los últimos 12 días de tratamiento; o hiperfraccionamiento con 79,2-81,6 Gy en 7 semanas, a razón de 1,2 Gy/sesión, dos veces al día.

- *Tumores de bajo a medio riesgo*: En sospechas de infiltración. Dosis entre 44-50 Gy (2,0 Gy/sesión) o 54-63 Gy (1,6-1,8 Gy/sesión).

En caso de presencia tumor residual ganglionar o la sospecha de enfermedad ganglionar persistente, se procederá a realizar un VGC. En caso de persistencia tumoral local se procederá a realizar cirugía de resección (cirugía de rescate) y VGC.

- **QT de inducción**: A base de docetaxel + cisplatino + 5-FU; o paclitaxel + cisplatino + 5-FU en infusión. Todos ellos, generalmente asocian un tratamiento posterior concurrente, con carboplatino + cetuximab, junto RT coadyuvante (70 Gy a 2.0 Gy/sesión, en los de alto riesgo; y 44-50 Gy a 2,0 Gy/sesión o 54-63 Gy a 1,6-1.8 Gy/sesión en los de bajo riesgo). En función de la respuesta, se plantea seguimiento o tratamiento coadyuvante:

- **Respuesta completa: RT coadyuvante**

- *Tumores de alto riesgo*: Infiltración local y ganglionar confirmada. Fraccionamiento en diferentes modalidades: 66 Gy (2,2 Gy/sesión) y 70 Gy (2,0 Gy/sesión) diariamente, lunes a viernes, durante 6-7 semanas; o 66-70 Gy (2,0 Gy/sesión) a 6 sesiones/semana; o RT acelerada concomitante con 72 Gy durante 6 semanas (1,8 Gy/sesión, con campo grande, 1,5 Gy como segunda sesión diaria durante los últimos 12 días de tratamiento; o hiperfraccionamiento con 79,2-81,6 Gy en 7 semanas, a razón de 1,2 Gy/sesión, dos veces al día.
- *Tumores de bajo a medio riesgo*: En sospechas de infiltración. Dosis entre 44-50 Gy (2,0 Gy/sesión) o 54-63 Gy (1,6-1,8 Gy/sesión).

En caso de presencia tumor residual ganglionar o la sospecha de enfermedad ganglionar persistente, se procederá a realizar cirugía mediante un VGC.

- **Respuesta parcial:**

- **RT únicamente**: Siguiendo los mismos principios de RT que en el caso de la Respuesta Completa, en la QT de inducción.
- **QT + RT coadyuvante**: Quimioterapia (a elegir entre altas dosis de cisplatino, cetuximab, carboplatino + 5-FU en infusión, 5-FU + hidroxycurea, cisplatino + paclitaxel, cisplatino + 5-FU en infusión, carboplatino + paclitaxel, o cisplatino 40 mg/m² semanal) + Radioterapia coadyuvante, con el mismo protocolo que en el caso de la Respuesta Completa, en la QT de inducción.

En caso de persistencia tumoral local o ganglionar, se procederá a realizar cirugía de resección (cirugía de rescate) y VGC.

- **Menos que respuesta parcial: Cirugía.**

- En caso de ausencia de complicaciones loco-regionales se complementará con **RT**, con el mismo protocolo que en el caso de la Respuesta Completa, en la QT de inducción.

- En caso de complicaciones como la afectación extracapsular ganglionar o márgenes de resección comprometidos: QT sistémica (altas dosis de cisplatino, cetuximab, carboplatino + 5-FU en infusión, 5-FU + hidroxycurea, cisplatino + paclitaxel, cisplatino + 5-FU en infusión, carboplatino + paclitaxel, o cisplatino 40 mg/m² semanal) + RT coadyuvante (70 Gy a 2.0 Gy/sesión, en los de alto riesgo; y 44-50 Gy a 2,0 Gy/sesión o 54-63 Gy a 1,6-1.8 Gy/sesión en los de bajo riesgo)

T4 con cualquier N

- **SÓLO Cirugía:**

- N0: Laringectomía total ± VCG ipsilateral o bilateral.
- N1: Laringectomía total + VCG ipsilateral ± contralateral.
- N2: Laringectomía total + VCG ipsilateral o contralateral

Tras el tratamiento valorar uno de los siguientes tratamientos coadyuvantes:

- **RT coadyuvante**

- *Tumores de alto riesgo:* Infiltración local y ganglionar confirmada. Fraccionamiento en diferentes modalidades: 66 Gy (2,2 Gy/sesión) y 70 Gy (2,0 Gy/sesión) diariamente, lunes a viernes, durante 6-7 semanas; o 66-70 Gy (2,0 Gy/sesión) a 6 sesiones/semana; o RT acelerada concomitante con 72 Gy durante 6 semanas (1,8 Gy/sesión, con campo grande, 1,5 Gy como segunda sesión diaria durante los últimos 12 días de tratamiento; o hiperfraccionamiento con 79,2-81,6 Gy en 7 semanas, a razón de 1,2 Gy/sesión, dos veces al día.
- *Tumores de bajo a medio riesgo:* Sospecha de infiltración. Dosis entre 44-50 Gy (2,0 Gy/sesión) o 54-63 Gy (1,6-1,8 Gy/sesión).

- **QT + RT coadyuvante:** QT sistémica (altas dosis de cisplatino, cetuximab, carboplatino + 5-FU en infusión, 5-FU + hidroxycurea, cisplatino + paclitaxel, cisplatino + 5-FU en infusión, carboplatino + paclitaxel, o cisplatino 40 mg/m² semanal) + RT coadyuvante (70 Gy a 2.0 Gy/sesión, en los de alto riesgo; y 44-50 Gy a 2,0 Gy/sesión o 54-63 Gy a 1,6-1.8 Gy/sesión en los de bajo riesgo)

T4 seleccionados que declinan la cirugía

- **QT + RT:** QT sistémica (altas dosis de cisplatino, cetuximab, carboplatino + 5-FU en infusión, 5-FU + hidroxycurea, cisplatino + paclitaxel, cisplatino + 5-FU en infusión, carboplatino + paclitaxel, o cisplatino 40 mg/m² semanal) + RT coadyuvante (70 Gy a 2.0 Gy/sesión, en los de alto riesgo; y 44-50 Gy a 2,0 Gy/sesión o 54-63 Gy a 1,6-1.8 Gy/sesión en los de bajo riesgo).
 - En caso de presencia tumor residual ganglionar o la sospecha de enfermedad ganglionar persistente, se procederá a realizar **cirugía** mediante un VGC.
 - En caso de persistencia del tumor original: **cirugía** (resección tumoral junto a VCG)

- **QT de inducción:** A base de docetaxel + cisplatino + 5-FU; o paclitaxel + cisplatino + 5-FU en infusión. Todos ellos, generalmente asocian un tratamiento posterior concurrente, con carboplatino + cetuximab, junto RT coadyuvante (70 Gy a 2.0 Gy/sesión, en los de alto riesgo; y 44-50 Gy a 2,0 Gy/sesión o 54-63 Gy a 1,6-1.8 Gy/sesión en los de bajo riesgo). En función de la respuesta, se plantea seguimiento o tratamiento coadyuvante:

Quirúrgico

Tumoral

La laringe es el órgano donde se ha descrito mayor número de técnicas quirúrgicas. Tras el desarrollo de la cirugía parcial por vía externa las técnicas más recientes son las endoscópicas. En todos los casos el objetivo es proponer una resección tumoral a través del tejido sano, sin olvidar la necesidad de tratar al mismo tiempo las áreas ganglionares si precisara. La decisión de realizar una laringectomía total o cirugía de conservación de la laringe (por ejemplo, resección transoral, hemilaringectomía, laringectomía supraglótica, etc.) será decidida por el cirujano, pero debe adherirse a los principios de extirpación tumoral completa, con intención curativa, y de preservación de la función, siempre que la seguridad oncológica esté asegurada.

De manera académica pueden dividirse las cirugías sobre la laringe como:

- **Parciales:**
 - **Supraselectivas** cuando se limitan a una localización puntual de la laringe o una de sus subdivisiones; en el caso del CEL-G están limitadas a la cuerda vocal, conservando la gran mayoría de las funciones laríngeas (cordectomías láser, cordectomías por laringofisura, cordectomías ampliadas a otro territorio o cordectomías bilaterales).
 - **Funcionales u organopreservativas:** aquella que amputando una subdivisión laríngea conserva la función fonatoria de la laringe (laringectomía supraglótica, laringectomía supracricoidea, laringectomía anterior o frontolateral, simples o ampliadas; hemilaringectomía).
- **Totales o mutilantes:** Exéresis casi completa (laringectomía *near total*) o completa de la laringe (laringectomía total), con pérdida de la función fonatoria y respiratoria de la laringe.

Por otro lado, la vía de abordaje diferencia **cirugías cerradas** (con abordaje transoral) o **abiertas** (con abordaje percutáneo), que se desarrollarán a continuación.

Cirugías parciales cerradas

Son aquellas que se llevan a cabo por vía oral, basándose fundamentalmente en el *láser* CO₂(50), electrocauterio supraselectivo o cirugía robótica.

Cirugía transoral laser (CTL)

Es una técnica mínimamente invasiva que se realiza mediante laringoscopia directa por suspensión, con un microscopio quirúrgico, instrumentos de microcirugía y un láser quirúrgico de CO₂. Junto con la laringectomía parcial supracricoidea, ha sido una de las dos áreas de mayor desarrollo en la cirugía de conservación de la laringe en los últimos años(160). Este abordaje contraria uno de los principios quirúrgicos considerados previamente, dado que el tumor es seccionado y eliminado por partes a través del laringoscopio. Sin embargo, la sección de la pieza revela la profundidad de penetración del tumor y permite una visualización clara de los márgenes quirúrgicos oncológicos durante el procedimiento. De hecho, permite el envío adicional de márgenes de resección para confirmar la ausencia del compromiso del mismo.

Tipo I	Corpectomía subepitelial
Tipo II	Corpectomía subligamentosa
Tipo III	Corpectomía transmuscular
Tipo IV	Corpectomía total
Tipo V	Corpectomía ampliada a:
Va	Comisura anterior y CV contralateral
Vb	Aritenoides
Vc	Subglotis
Vd	Ventrículo

Figura 10. Clasificación de las corpectomías por vía endoscópica de la *European Laryngological Society* (ELS)⁷

Los pacientes susceptibles a dicho tratamiento son aquellos con tumores accesibles por vía transoral. Actualmente es un procedimiento bien establecido para carcinomas supraglóticos o glóticos T1-T2(160), donde la corpectomía es la principal técnica en el CEL-G; que consiste en la exéresis parcial o completa, de una o ambas cuerdas vocales. En el año 2000 la *European Laryngological Society* (ELS) publicó la clasificación de las corpectomías(161) lo que ha permitido codificar a la perfección el tipo de resección (Figura 10).

Adicionalmente, algunos autores utilizan esta técnica para determinados tumores glóticos T3 (fijación de la cuerda vocal debida a la invasión directa del músculo tiroaritenoides por el tumor), tumores T3 supraglóticos (con invasión limitada del espacio preepiglótico) y también en algunos casos T4 (invasión limitada de la base lingual). De hecho, en el caso de los tumores avanzados (estadios III y IV) los resultados son prometedores, con tasas de preservación laríngea del 86%(162) y tasas de supervivencia global del 47-58%(162, 163). Estos resultados sugieren que cuando la resección completa es técnicamente posible, la laringectomía supraglótica endoscópica se puede hacer, incluso en casos moderadamente avanzados (T3) con tasas de control local comparables a las de la laringectomía supraglótica abierta(160), siempre y cuando se asegure que los márgenes de resección son negativos. La afectación tumoral del margen quirúrgico después de una CTL se ha asociado con mayores tasas de recurrencia local y metástasis a distancia, menor tasa de supervivencia específica, y la necesidad de cirugía de rescate(164).

⁷ Extraído de Remacle et al. *Endoscopic cordectomy. A proposal for a classification by the Working Committee, European Laryngological Society*. Eur Arch Otorhinolaryngol. 2000;257(4):227-31)

Los resultados funcionales de CTL son generalmente superiores a los de la vía abierta convencional, en términos de tiempo necesario para restablecer la deglución, tasa de traqueotomías, incidencia de fístulas faríngeas, y menor tiempo de hospitalización(165). Esto es debido a que, en contraste con la cirugía abierta de laringe, el marco cartilaginoso de la laringe y los músculos infrahioideos se conservan durante las resecciones endoscópicas, lo que se cree que mejora la función postoperatoria.

Cirugía robótica transoral (CRT)

Es una técnica que progresivamente se va implantando en los hospitales donde se realiza cirugía mínimamente invasiva de cabeza y cuello. Las grandes ventajas que proponen los propulsores de la cirugía asistida por robot son la excelente visualización tridimensional y la cirugía a 2 o 3 manos. El ángulo mayor de visión y las lentes anguladas aumenta el rango de visión del campo quirúrgico endoscópico en comparación con el campo visual de “visión recta” otorgado por el microscopio. Además, permite llevar a cabo movimientos precisos, libres de temblor, en un espacio limitado y profundo, con ángulos de trabajo generalmente no logrados con instrumentos no robóticos(160). Dado lo moderno de su implantación, actualmente comienzan a recogerse resultados oncológicos que son prometedores(166), sobre todo en localizaciones de difícil acceso como la comisura anterior(167).

Cirugías parciales abiertas

Laringectomía vertical parcial (LVP)

La LVP (o hemilaringectomía vertical)(160) abarca un espectro de procedimientos que van desde la cordectomía por laringofisura a la hemilaringectomía extendida. Todos estos procedimientos tiene en común la transección vertical del cartílago tiroides y la resección de la glotis, extendida al espacio paraglótico. Las incisiones verticales se hacen a través del cartílago tiroides cerca de la comisura anterior y justo por delante del borde posterior del cartílago tiroides. La resección incluye la cuerda vocal afectada por el tumor y la subglotis próxima, el ventrículo, la banda ventricular, y el repliegue aritenopiglótico. Este área puede extenderse alrededor de la comisura anterior para incluir al tercio anterior de la cuerda vocal contralateral si es necesario, en cuyo caso, se denomina hemilaringectomía frontolateral.

Este procedimiento está indicado para los tumores T1 y T2 de glotis, con una tasa de control local y de preservación laríngea del 82-95% y una tasa de supervivencia a 5 años superior al 90%(168). Para otros autores, la afectación de la comisura anterior y los T2 generaban más controversia, dado que presentaban unas tasas de control local notablemente menores(169). De igual modo, el control local y la supervivencia a 5 años en los tumores T3 fue significativamente menor(170).

Dados estos resultados, sobre todo en los casos T2 y T3, la LVP fue reemplazada por la laringectomía supracricóidea en muchos centros. Además, con el avance de la cirugía láser, el papel de la LVP es cuestionable dado que la CTL proporciona idénticas tasas de control local, con una calidad de voz y una función deglutoria superior, además de una menor tasa de complicaciones(171). Por todo ello, la LVP es una técnica quirúrgica que está siendo sustituida progresivamente.

Laringectomía supraglótica (LSG)

Descrita por Alonso(172) y modificada a su técnica actual por Ogura(173), consiste en la resección de la epiglotis, las bandas ventriculares, los repliegues aritenoepliglóticos, el hueso hioides (en la mayoría de los casos), la parte superior del cartílago tiroides y el contenido del espacio preepiglótico (Figura 11). La resección puede extenderse para incluir un aritenoides, la base de la lengua o el seno piriforme(160).

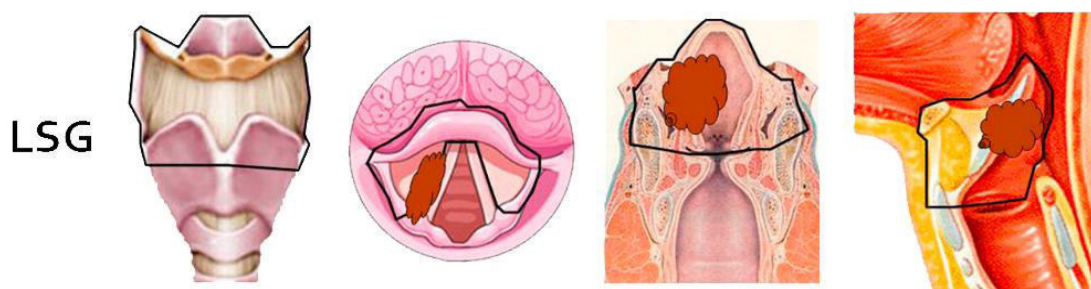


Figura 11. Técnica quirúrgica de Laringectomía Supraglótica (LSG)⁸

Tras la resección, el paciente conserva una muy buena calidad vocal siendo el reto conseguir una deglución normal, dada la ausencia de los mecanismos de protección que aportaban la epiglotis y bandas ventriculares.

La laringectomía supraglótica está indicada en los CEL supraglóticos T1-T2 y en pacientes con tumores T3 y T4 supraglóticos que afectan al espacio preepiglótico o un aritenoides, o que se extienden hacia el seno piriforme o la base de la lengua.

En general la tasa de supervivencia a los cinco años es comparable a la obtenida con la laringectomía total, y oscila entre el 67 y el 90%(160). Esta tasa es >85% para tumores en estadios I-II, entre 75–80% para el estadio III, y entre 55 y 70% de los pacientes en estadio IV(174, 175). Sin embargo, la tasa de supervivencia de estos tumores depende más de la presencia y extensión de las metástasis ganglionares que del tamaño del tumor primario(175, 176).

Laringectomía supracricóidea (LSC)

La LSC fue originalmente desarrollada por Majer y Rieder, en 1959(177). Es una técnica de preservación funcional y de conservación laríngea que consiste en la resección de las cuerdas vocales, las bandas ventriculares, repliegues aritenoepliglóticos, epiglotis, subglotis superior del cartílago cricoides, cartílago tiroides y contenido pre y paraglótico; puede incluir un aritenoides, pero debe preservar el hueso hioides.

⁸ Extraído con permiso de Elsevier España, S.L; de Rodrigo JP et al. *El papel actual de la cirugía parcial como estrategia de preservación funcional en el carcinoma de laringe*. Acta Otorrinolaringol Esp 2011;62:231-8

Tras la exéresis, la reconstrucción puede realizarse mediante(160):

- Cricohioidoepiglottopexia (CHEP): En los casos en que la parte inferior de la epiglotis está afectada, la epiglotis suprahioidea puede ser preservada y utilizada en la reconstrucción (Figura 12).

Está indicada en tumores glóticos T2 (especialmente con afectación de la comisura anterior), T3 y casos seleccionados T4 (invasión limitada del cartílago tiroides). Está contraindicada en casos de fijación de la articulación cricoaritenoides, invasión de la comisura posterior, invasión del cricoides, extensión extralaringea del tumor o mala función pulmonar.

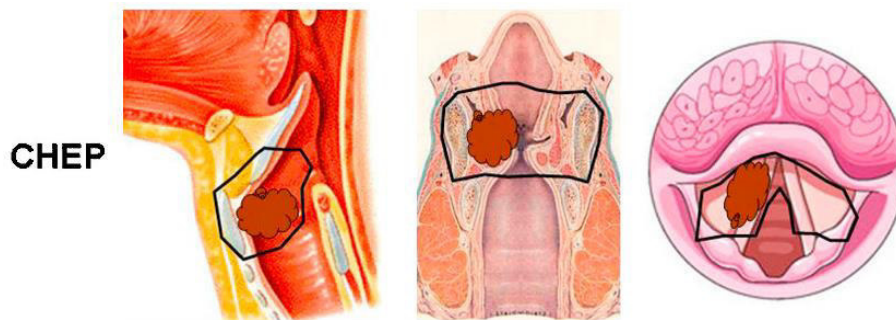


Figura 12. Técnica quirúrgica de Laringectomía Supracricóidea (LSC) en su variante de Cricohioidoepiglottopexia (CHEP)⁹

- Cricohioidopexia (CHP): En los casos en que no es oncológicamente factible preservar la epiglotis, la reconstrucción implicará la impactación de la base de la lengua/complejo hioideo al cartílago cricoides (Figura 13).

Está indicada en tumores supraglóticos extendidos a la cuerda vocal o comisura anterior (T2-T4) y en los tumores transglóticos (T2-T4). Las limitaciones son las mismas que para la LPSC-CHEP, junto con la invasión del hueso hioides.

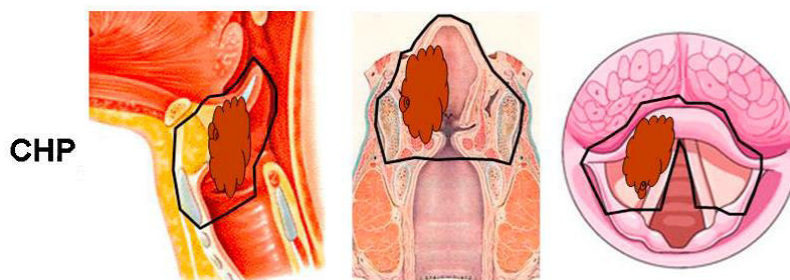


Figura 13. Técnica quirúrgica de Laringectomía Supracricóidea (LSC) en su variante de Cricopiglotopexia (CHEP)¹⁰

⁹ Extraído con permiso de Elsevier España, S.L; de Rodrigo JP et al. *El papel actual de la cirugía parcial como estrategia de preservación funcional en el carcinoma de laringe*. Acta Otorrinolaringol Esp 2011;62:231-8

¹⁰ Extraído con permiso de Elsevier España, S.L; de Rodrigo JP et al. *El papel actual de la cirugía parcial como estrategia de preservación funcional en el carcinoma de laringe*. Acta Otorrinolaringol Esp 2011;62:231-8

Las tasas de control local y preservación de órgano de la LSC como tratamiento primario en T2 y T3 superan el 90% y son comparables a la QT y RT, y también con la laringectomía total(178, 179). Funcionalmente, tras la recuperación, la calidad de voz es sustancialmente diferente aunque generalmente con una percepción subjetiva aceptable(180). La recuperación de la deglución puede tardar varias semanas, pero tras una rehabilitación intensiva se alcanzan tasa de recuperación del 80-90% dentro del primer año(181).

Cirugías totales

Laringectomía near total

En 1980 Pearson describe la hemilaringectomía ampliada para los carcinomas T3 de laringe con preservación de la voz y de la deglución, como alternativa a la laringectomía total (LT). Ésta se basa en la creación de una fístula faringotraqueal utilizando los restos miomucosos laríngeos, con integridad de su inervación recurrential; que es capaz de cerrarse de forma activa durante la deglución y de abrirse durante la fonación, comportándose como una neoglótis. De esta forma se consigue la extirpación de un espacio paraglótico, creando una fístula dinámica fisiológica que permite una fonación sin prótesis(182). Aunque estos pacientes se quedan con una traqueotomía permanente, la fonación se mantiene a través de un *shunt* dinámico a partir de los tejidos no comprometidos de la laringe.

La laringectomía casi total es un procedimiento de preservación de la voz que puede ser considerado como una alternativa a la laringectomía total para pacientes seleccionados con cánceres lateralizados, localmente avanzados, de laringe e hipofaringe. En nuestro país la técnica de Pearson fue desarrollada fundamentalmente por Gavilán(183). Desafortunadamente, el procedimiento no ha ganado amplia aceptación debido a los temores percibidos de la complejidad quirúrgica, con una desaparición progresiva dados los protocolos de conservación de órgano o como opción quirúrgica la laringectomía total(184).

Laringectomía total primaria

Consiste en realizar la exéresis completa de la laringe con lo que la vía aerodigestiva se interrumpe, para llevar a cabo la respiración a través de un estoma traqueocutáneo. Se deglute a través de la faringe, como único camino hacia el esófago. Por tanto, proporciona una separación completa y permanente de vía aérea superior de la inferior, dando por resultado la pérdida de la capacidad fonatoria y la olfacción, al dejar de pasar el aire a través de las fosas nasales(185).

Está indicada cuando la extensión local del tumor primario contraindica la realización de una laringectomía parcial funcional. En los cánceres glóticos, la fijación del aritenoides y la invasión subglótica son los factores determinantes para una opción radical. En los cánceres supraglóticos, la extensión masiva al espacio preepiglótico, el compromiso con fijación de una cuerda vocal y/o la extensión fuera de los límites de la laringe son los que motivan la laringectomía total(71). También se puede practicar en estenosis laríngeas postraumáticas o en casos de tumores benignos extensos con potencial maligno, como la papilomatosis laríngea recurrente(185).

La primera laringectomía total para un tumor maligno fue realizada por Billroth en 1873(186). Debido a la alta mortalidad asociada, se propuso realizar la intervención en dos etapas: separación de la tráquea de la laringe y la propia laringectomía total(187). Fue Sorenson quien perfeccionó, en 1890, una nueva técnica de laringectomía total en un solo paso, muy similar a la actual(185). Después de múltiples mejoras en la técnica y la instrumentación, Martin y Ogura normalizaron la laringectomía total con disección del cuello, alrededor de 1950(188). La incisión cutánea, en “U” bimastoidea con borde inferior superior al *scutum* esternal, permite la realización de un vaciamiento ganglionar en la misma intervención. La resección se extiende de las vallecúlas a la región superior de la tráquea. El cierre del faringostoma debe realizarse de forma cuidadosa mediante puntos separados con sutura reabsorbible. La traqueostomía se practica mediante la fijación de la tráquea a la piel.

La hermeticidad de la faringe se confirma hacia el 10° día con la realización de una prueba de azul o con un tránsito faríngeo con contraste hidrosoluble, tras lo que puede reanudarse la alimentación oral. Las posibles complicaciones postoperatorias son la fístula salival, que necesita cuidados locales mediante vendaje compresivo, y la traqueítis costrosa, que justifica la utilización sistemática de aerosoles humidificadores.

La laringectomía total tiene consecuencias dramáticas sobre el paciente, principalmente a través de la capacidad fonatoria (una función social esencial), pérdida del olfato y la posibilidad de calentar, humidificar y filtrar el aire inhalado; además del impacto del estoma traqueal sobre el paciente o la sociedad. Actualmente existen cuatro métodos principales de rehabilitación vocal para los pacientes laringectomizados: voz esofágica o erigimofónica, electrolaringe, laringe artificial neumática y prótesis de derivación traqueoesofágica o prótesis fonatorias. Entre ellas, la rehabilitación vocal por prótesis vocales, después de la laringectomía total, ha representado el *gold standard* en las últimas dos décadas(189).

Laringectomía total de rescate

Dado la tendencia no quirúrgica, en la era de la preservación de órganos, la laringectomía total ha tomado cada vez más un papel de *cirugía de rescate*. La laringectomía total de rescate se está realizando en muchos centros en todo el mundo para casos con recidiva tumoral tras tratamiento no quirúrgicos, radioterapia o quimioradioterapia combinada. De manera evidente, con los protocolos de conservación laríngea, la incidencia de la laringectomía total de rescate está aumentando gradualmente mientras que la laringectomía total primaria está en declive.

Las tasas de complicaciones de este procedimiento no suelen ser reportadas en las series publicadas, pero alcanzan el 67,5%, incluyendo la infección de la herida quirúrgica, la dehiscencia de sutura y el sangrado. Dentro de las complicaciones más frecuentes está la fístula faringocutánea o faringostoma, que está presente en el 28,9% todos los pacientes sometidos a laringectomía total de rescate(190).

Vaciado endolaríngeo

Desarrollada por el Prof. Dr. Álvarez Vicent en 1971(191) consiste en una técnica quirúrgica de extracción de la laringe *blanda*, conservando el esqueleto laríngeo. Para ello se practica una separación de subpericondrial de todas las estructuras blandas de la laringe hasta la región subglótica, conservando el cartílago tiroides no afectado. Esta técnica permitía una seguridad oncológica con una fonación y deglución aceptables.

Para ello la laringe se abre desde atrás y el pericondrio se secciona a lo largo del borde superior de los músculos tiroideos, seccionando la musculatura prelaríngea. El pericondrio interno es separado y desprendido desde arriba con desplazamiento posterior de la epiglotis. De esta manera el contenido blando de la laringe se extrae como un calcetín, conservando el esqueleto laríngeo intacto.

Con el tiempo esta técnica no acabó imponiéndose por el desarrollo de las técnicas laser endolaríngeas. Estas técnicas son conceptualmente análogas al vaciado endolaríngeo sin requerir la apertura del esqueleto laríngeo y con menor morbilidad en la deglución.

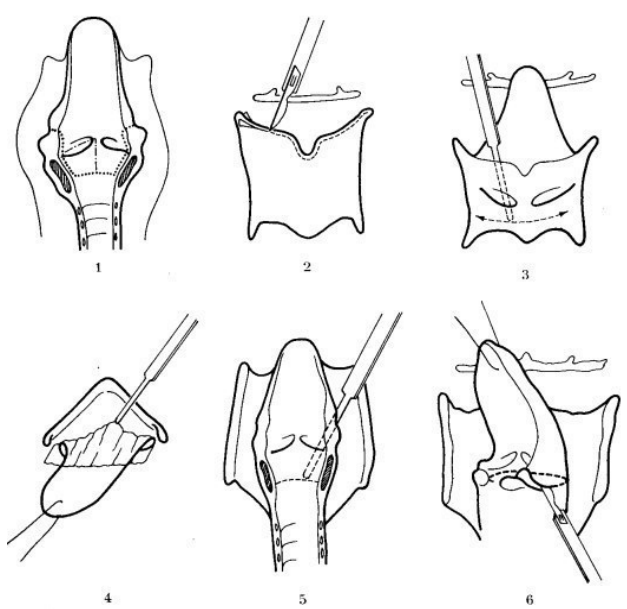


Figura 14. Técnica quirúrgica del Vaciado endolaríngeo¹¹

Ganglionar

Vaciamiento ganglionar

La invasión ganglionar inicial de los pacientes que presentan un carcinoma epidermoide de las vías aerodigestivas superiores es un factor que influye en el pronóstico. La afectación ganglionar metastásica se produce de manera secuencial y, teóricamente, predecible. El tratamiento de las masas

¹¹ Extraído con permiso de Elsevier Masson SAS de J.J. Álvarez Vicent. *Laryngectomie fonctionnelle selon la technique de l'évidement sous-périchondral du larynx*. Ann. Oto-Laryng. (Paris), 1975, t. 92, nº 1-2 (pp. 61-72).

cervicales efectivas o potenciales debe adaptarse a la localización del tumor inicial y al estadio evolutivo locorregional(192).

Con el fin de optimizar la eficacia terapéutica, a la vez que se limita la morbilidad, se fueron desarrollando varios tipos de vaciamiento ganglionar, proponiéndose distintas clasificaciones. Una de ellas, es la recomendada por el *AHNS/AAO-HNS, Committee for Head and Neck Surgery and Oncology of the American Academy of Otolaryngology - Head and Neck Surgery*(193) que permite la normalización de la terminología. Esta clasificación opone los vaciamientos cervicales completos a los vaciamientos cervicales parciales o selectivos.

- **Vaciamientos radicales completos:** Los vaciamientos cervicales completos son los que extirpan el tejido celuloganglionar de los niveles I al V. Todos los vaciamientos de este grupo son radicales y deben adaptarse a cada situación clínica.
 - Radical tradicional: Se sacrifica el músculo esternocleidomastoideo, el nervio espinal y la vena yugular interna.
 - Radical tradicional ampliado: Se amplía la resección del vaciamiento radical tradicional a otras estructuras, como los nervios craneales, los músculos, la piel, etc.
 - Radical modificado (literatura anglosajona) o Funcional (literatura europea): Se han descrito varios tipos de vaciamiento radical modificado, según el tipo de estructura que se conserva.
 - Funcional Tipo I: Conservación del nervio espinal.
 - Funcional Tipo II: Conservación del nervio espinal y del músculo esternocleidomastoideo, con resección de la vena yugular interna.
 - Funcional Tipo III: Esta técnica corresponde al vaciamiento radical tradicional con conservación del nervio espinal, el músculo esternocleidomastoideo y la vena yugular interna.
- **Vaciamientos parciales o selectivos:** Estas intervenciones resecan de forma selectiva algunos grupos ganglionares que presentan riesgo de micrometástasis en los cuellos N0.
 - Vaciamiento supraomohioideo: niveles I, II y III y constituye la técnica más adecuada para los CECO.
 - Vaciamiento yugular: niveles II, III y IV y está indicada para los carcinomas de la faringe y de la laringe.
 - Vaciamiento del compartimento central: en el caso de carcinomas tiroideos.
 - Vaciamiento posterolateral: vaciamiento del triángulo cervical posterior, del nivel V y de la cadena yugular profunda de los niveles II, III y V. Está indicada en los melanomas y carcinomas epidermoides del cuero cabelludo posterior.

Biopsia de ganglio centinela

La biopsia del ganglio linfático centinela es una alternativa a la disección electiva del cuello para identificar metástasis cervicales ocultas en pacientes con CECO temprana (T1 o T2) en centros donde se

dispone de experiencia para este procedimiento(50). Sus ventajas incluyen una morbilidad reducida y un resultado cosmético mejorado. Las tasas de detección de ganglios centinelas superiores al 95% han sido ampliamente publicadas(26, 194), sobre todo en CECo relacionados con el VPH. Los ganglios donde se demuestre la afectación metastásica deben ser extirpados, mientras que el resto deben ser observados evolutivamente.

La biopsia del ganglio centinela es un procedimiento técnicamente exigente y las tasas de éxito dependen de la experiencia. Aún con ello, la exactitud de la biopsia del ganglio centinela para la estadificación nodal del CECo temprano se ha probado ampliamente en múltiples estudios con una estimación combinada de sensibilidad del 93% y valores predictivos negativos de 88%(50, 195). Lamentablemente en la actualidad no se dispone de series centradas en el CEL, aunque dada la relación de su desarrollo pareja al estudio del VPH, es probable que en los próximos años se desarrollen estudios al respecto.

Radioterapia

Desde la descripción de las primeras series de cánceres laríngeos tratados mediante irradiación al principio del siglo XX, la radioterapia ha adquirido un lugar destacado en el tratamiento de los CEL, de forma exclusiva o como complemento de la cirugía o quimioterapia (RT coadyuvante o concurrente).

La dosis de radiación para los CECyC varía generalmente de 60 a 70 Gy(50, 196), dependiendo del momento del tratamiento y del tratamiento adyuvante elegido. La técnica más utilizada emplea fotones de cobalto 60, rayos X de 4-6 megavoltios y electrones de los aceleradores lineales. Las técnicas de imagen, la dosimetría tridimensional y las posibles modificaciones del fraccionamiento han permitido mejorar la precisión de las irradiaciones y su eficacia biológica. La radioterapia contemporánea corresponde a una definición de los volúmenes tumorales y de los tejidos sanos en el espacio (definición tridimensional) que permite la obtención de un índice terapéutico óptimo (radioterapia de conformación). En todos los casos, la puesta en marcha de un tratamiento se verá precedida por una simulación.

El riesgo de toxicidad a largo plazo de la radiación aumenta con la administración de dosis superiores a 55 Gy en las glándulas salivales, los músculos constrictores faríngeos y la glándula tiroides, dando lugar a xerostomía, disfagia, aspiración crónica e hipotiroidismo(197). Los avances recientes con la radioterapia de intensidad modulada permiten provocar menor toxicidad en las glándulas salivales con una reducción de la xerostomía. No obstante, en la mayoría de los pacientes debe aconsejarse una revisión dental, posiblemente completado con fluoración para evitar una periodontitis crónica.

Quimioterapia

La elección de la terapia sistémica debe individualizarse en función de las características del paciente. El abordaje estándar de quimiorradioterapia (QT-RT) para pacientes con enfermedad localmente avanzada sigue siendo cisplatino y RT concurrente.

Puede usarse la quimioterapia de inducción (QTi) basada en cisplatino, seguida de tratamiento locorregional basado en la RT. Sin embargo, no se ha establecido una mejoría en la supervivencia global con la QTi en comparación con proceder directamente a la QT concomitante tras la cirugía(50). Los

estudios aleatorizados de fase III que comparan quimioterapia secuencial vs. RT con quimioterapia vs. RT concurrentes están en curso y no han demostrado un beneficio consistente en la supervivencia con la incorporación de QT(50).

Por tanto, el papel de la QT está todavía en entredicho, siendo una opción aceptada para los T3 susceptibles a laringectomía total (N2,N3) y T4 seleccionados que declinan la cirugía, según las últimas guías del NCCN(50). La inclusión de los taxanos (como el doxetacel, paclitaxel o cabazitaxel) añadidos al cisplatino y 5-fluorouracilo previo, se ha convertido en el régimen de inducción estándar, revelando una mejora significativa en la supervivencia libre de enfermedad y la supervivencia global para el régimen con taxanos vs. regímenes sin taxanos(198, 199).

Recidiva

La recidiva local y regional depende en gran medida de la etapa inicial y del sitio de la enfermedad. En el caso del CEL debe hacerse una distinción entre el cáncer glótico (CEL-G) y el cáncer supraglótico, ya que el CEL-G se reconoce a menudo en una etapa temprana, mientras que los cánceres de la laringe supraglótica a menudo se presentan con metástasis regionales, lo que provoca tasas de supervivencia más bajas (200).

Las recaídas locales y nodales dependen de la serie revisada, presentando datos altamente variables debido a la estadificación en el momento del diagnóstico, el tratamiento prescrito y el seguimiento. Además, se observa una resistencia importante a publicar los índices de recidiva. Algunos autores informan una tasa de recurrencia local de 0-20% en T1-T2(201) en comparación con 16-33% en T3-T4(202, 203), o sin estratificarlas, de manera global, alcanza 32,4-45,16%(16, 204). Las recurrencias regionales alcanzan el 6,8 al 51,61%(16, 203-206).

VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO (VPH)

Se trata de un virus perteneciente a la familia *Papillomaviridae*, de pequeño tamaño, sin envoltura, con ácido desoxirribonucleico (ADN) circular bicatenario con 8000 pares de bases.

Tienen una cápside icosaédrica formada por dos proteínas, L1 y L2. La L1 o mayor, se autoensambla para formar la cápside, y es el objeto objetivo de las vacunas recientes antiVPH. La L2 o menor, es un componente secundario de la cápside que ayuda en su síntesis, que puede resultar interesante como un posible objetivo futuro para vacunas de protección más amplia contra el virus(207).

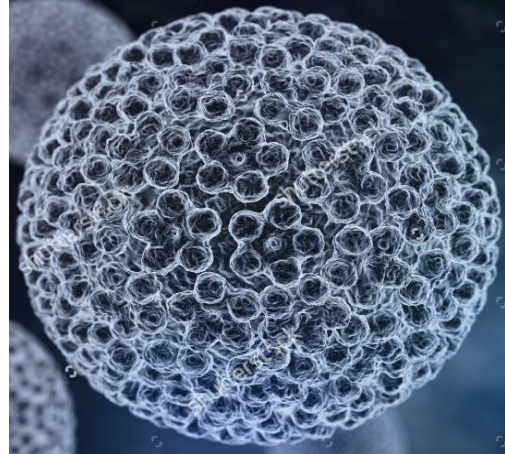


Imagen extraída de <https://www.shutterstock.com/>
(ID de ilustración: 268499840)

El genoma ADN está organizado en tres regiones: reguladora superior, temprana y tardía. La región reguladora superior alberga los factores de transcripción que controlan la expresión de genes. La región temprana codifica seis genes (E1, E2, E4, E5, E6 y E7) imprescindibles para la replicación del ADN viral y el ensamblado de las nuevas partículas virales producidas por la célula infectada(208). La región tardía codifica las proteínas de la cápside, L1 y L2.

El VPH utiliza la maquinaria celular para introducir su material genético en el núcleo de la célula huésped directamente o en forma episomal (forma libre en el núcleo). Esto provoca la alteración del genoma del huésped, con una cascada de acontecimientos que conlleva la replicación no controlada, es decir, el cáncer. Este patógeno es el factor más importante en el desarrollo de neoplasias anogenitales, siendo absolutamente necesario en el desarrollo del carcinoma epidermoide de cérvix uterino. El conocimiento de este hecho, de su patrón biológico molecular y de su fisiopatología, ha llevado a buscar la implicación de este virus en otras regiones anatómicas, entre las que se encuentra la cabeza y el cuello, y por ende, la laringe. En los últimos diez años, con el desarrollo de las técnicas de detección se ha conseguido aislar el virus en múltiples localizaciones.

La *International Agency for Research on Cancer* (IARC) ha encontrado una relación causal entre la infección por VPH y el desarrollo de neoplasias en cuello uterino, pene, vulva, vagina, ano, orofaringe(31). En proceso están otras revisiones para valorar el efecto en el cáncer de esófago u otros cánceres digestivos(102). La presencia del VPH en muestras de CEL está demostrada(12-25), pero todavía su implicación real en la oncogénesis de dichos CELs está en entredicho. En Europa, se estima que aproximadamente el 30% de todos los cánceres relacionados con VPH ocurren en varones(209).

Serotipos de VPH

En la actualidad han sido descritos más de 170 subtipos de VPH habiendo sido demostrado potencial cancerígeno en al menos 40 subtipos. De entre estos 40 subtipos, 14 han sido detectados en casi todas las biopsias correspondientes a carcinoma invasivo de cérvix; siendo considerados por tanto

como de *alto riesgo oncogénico* (VPH-AR). Algunos de estos subtipos han sido hallados también en diferentes localizaciones de la cabeza y el cuello, en relación con el CECyC.

Se agrupan en cinco géneros: Alphapapillomavirus (α -PV), Betapapillomavirus (β -PV), Gammapapillomavirus (γ -PV), Mupapillomavirus (μ -PV) y Nupapillomavirus (ν -PV). Los papilomavirus humanos se pueden encontrar como comensales colonizando epitelios humanos, pero su importancia clínica está en asociación con varias lesiones cutáneas y mucosas que varían de verrugas benignas a varios tipos de cáncer. Según el sitio preferencial de infección, el VPH ha sido tradicionalmente dividido en tipos de mucoso (generalmente α -PV), predominantemente en lesiones anogenitales; y tipos cutáneos (generalmente β -PV, γ -PV, μ -PV, ν -PV y un subconjunto de α -PV), típicamente aislado de la piel y folículos pilosos.

A partir de los datos obtenidos de biopsias de carcinoma genital se confeccionó el listado de serotipos de VPH en función de su especie y riesgo (Figura 15):

HPV SPECIES (alpha)	HPV GENOTYPE	RISK	HPV SPECIES (alpha)	HPV GENOTYPE	RISK	HPV SPECIES (alpha)	HPV GENOTYPE	RISK
9	HPV 52	High	10	HPV 6	Low	4	HPV 57	Undetermined
	HPV 67	Undetermined		HPV 11	Low		HPV 2a	Undetermined
	HPV 33	High		HPV 13	Low		HPV 27	Undetermined
	HPV 58	High		HPV 74	Undetermined	15	HPV 71	Undetermined
	HPV 16	High		HPV 44	Low		HPV 90	Undetermined
	HPV 31	High		HPV 55	Undetermined	3	HPV 61	Low
	HPV 35	High	8	HPV 91	Undetermined		HPV 72	Low
11	HPV 34	Undetermined		HPV 7	Undetermined		HPV 62	Undetermined
	HPV 73	Probably high		HPV 40	Low		HPV 81	Low
7	HPV 59	High		HPV 43	Low		HPV 83	Undetermined
	HPV 18	High	1	HPV 32	Undetermined		HPV 89	Low
	HPV 45	High		HPV 42	Low		HPV 84	Undetermined
	HPV 70	Low	13	HPV 54	Low		HPV 86	Undetermined
	HPV 39	High					HPV 87	Undetermined
	HPV 68	Probably high				2	HPV 28	Undetermined
5	HPV 85	Undetermined					HPV 3	Undetermined
	HPV 26	Probably high					HPV 10	Undetermined
	HPV 69	Undetermined					HPV 29	Undetermined
	HPV 51	High					HPV 77	Undetermined
6	HPV 82	Probably high						
	HPV 30	Undetermined						
	HPV 53	Probably high						
	HPV 56	High						
	HPV 66	Probably high						

Figura 15. Clasificación de los α -VPH en función de su serotipo y oncogenicidad¹²

El género clínicamente más importante es, evidentemente, el α -PV, que asocia más de 40 tipos diferentes de VPH que pueden dividirse en tipos bajos y de alto riesgo definidos por su riesgo de progresión a malignidad. Los tipos de bajo riesgo (los más importantes son el VPH6 y el VPH11), VPH-BR,

¹² Extraído con permiso de Massachusetts Medical Society de Muñoz et al. *Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer*. N Engl J Med. 2003 Feb 6;348(6):518-27.

se asocian principalmente con lesiones benignas, como verrugas anogenitales y papilomas laríngeos, y los tipos de alto riesgo, VPH-AR (donde el más importante y estudiado es el VPH16) en el desarrollo de carcinoma cervical, anal, vaginal y CECyC. Después de estudios pormenorizados se definen los serotipos en función del grado de potencial oncogénico demostrado(210) (Tabla 1):

Grado de Certeza	Serotipos VPH
Alto riesgo Establecido	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59
Alto riesgo Probable	26, 53, 66, 68, 73, 82
Bajo Riesgo Establecido	6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81

Tabla 1. Grado de oncogenicidad de los serotipos VPH (extraído de Muñoz et al. *Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. N Engl J Med. 2003 Feb 6;348(6):518-27.*)

Incidencia

La incidencia de la infección por el VPH varía según la edad y el género. La prevalencia global de la infección por VPH en el área genital fue 26,8% en una gran cohorte de mujeres; que aumentaba al 44,8% en mujeres de 20-24 años(211). En estudios centrados en hombres se encuentra una prevalencia de VPH de hasta 50%, estable en todos los grupos de edad; hecho diferencial con estudios centrados en mujeres que revelaban que la incidencia de nuevas infecciones por VPH disminuye con la edad(212). En Europa, se estima que aproximadamente el 30% de todos los cánceres relacionados con VPH ocurren en varones(209).

Un reciente estudio centraba el análisis de la prevalencia del VPH en cavidad oral, encontrando una prevalencia en hombres y mujeres, de 14-69 años, en el 6,9%; siendo la prevalencia mayor en los hombres(213). La infección fue menos frecuente entre aquellos pacientes sin antecedentes de cualquier tipo de contacto sexual (0,9% vs 7,5%, $p < 0,001$) y aumentó con el número de parejas sexuales ($p < 0,001$) y cigarrillos fumados al día ($p < 0,001$).

La mayoría de las infecciones por el VPH son eliminadas por el sistema inmunitario en un plazo de 2 años(212). La eliminación es progresiva siendo del 40% a los 6 meses, del 66% a los 12 meses y del 90% a los 24 meses. Sin embargo, en los hombres, el VPH16 ha sido identificado como uno de los serotipos que más lentamente se eliminan, tardando casi 2 veces más en ser eliminado que otros serotipos. Este hallazgo es muy interesante dado que el VPH16 es el tipo viral que representa más del 90% de los cánceres orofaríngeos y es el más frecuentemente encontrado en series de CEL(27).

Fisiopatología

El VPH puede provocar lesiones sintomáticas o asintomáticas, benignas o malignas, como los cánceres anogenitales(214) y CECyC(6, 26, 27, 29).

Se conocen 120 genotipos del VPH que infectan a humanos. De todos ellos, los genotipos de VPH16 y VPH18 son los principales responsables de las neoplasias. Por otro lado, el VPH también es responsable de otras enfermedades como la papilomatosis respiratoria recurrente juvenil y las verrugas genitales, causadas generalmente por los tipos VPH6 y VPH11(215).

Aunque la presencia del VPH es necesaria para el desarrollo del cáncer de cérvix, ésta por sí sola no es una causa suficiente para producirlo. Existen otros cofactores que son necesarios para que la infección viral progrese, tanto exógenos (tabaco, alta paridad, anticonceptivos hormonales a largo plazo, coinfección con el VIH, *Chlamydia trachomatis*, VHS tipo 2, dietas deficientes en ciertos nutrientes etc.) como endógenos (hormonas endógenas, factores genéticos, inmunosupresión). Ninguno de estos factores ha sido demostrado en los CECyC, por lo que probablemente sean necesarios estudios al respecto.

Trasmisión

La transmisión del virus suele ocurrir después de un contacto epitelial con una superficie infectada por el virus, fundamentalmente por vía sexual; que en el caso del carcinoma de cérvix se relaciona estadísticamente con el inicio precoz de las relaciones sexuales. La probabilidad de transmisión del virus por un acto sexual es muy alta, notablemente mayor que para el VIH o el VHS tipo 2. Tras un único contacto infectante, la posibilidad de contagio en el área genital se estima del 50% en el varón y del 70% en la mujer(216). Es obvio que la colonización por el virus depende, por tanto, en gran medida del número de parejas sexuales y de la ausencia de uso de métodos de barrera. Por ello, las estrategias de los planes de prevención deben de ir encaminadas a una adecuada información y educación sexual.

Aunque infrecuente también puede producirse una transmisión perinatal del VPH y causar una papilomatosis respiratoria recurrente en niños. Por ello, en casos de mujeres con grandes condilomas acuminados que ocupan el canal del parto, se recomienda la realización de una cesárea para disminuir el riesgo de transmisión perinatal(217).

Infección

El VPH está perfectamente adaptado a la célula epitelial de la piel o mucosa, para explotar la maquinaria celular para su propio desarrollo; no así a epitelios simples como los del colon o del pulmón. Por tanto, es un patógeno exclusivamente intraepitelial cuya infección comienza cuando alcanza la membrana basal, uniéndose y penetrando en el interior de las *células stem* epiteliales. El ciclo infeccioso del virus es bastante complejo, lo que explica la duración tan característica de la infección(214). Las *células stem*, en condiciones normales, están constantemente en replicación; y las células derivadas de dicha replicación en la capa basal comienzan un desarrollo vertical desde la base a la superficie, perdiendo su capacidad replicadora y ganando diferenciación celular. Sin embargo, tras la infección de la *célula stem* por el VPH, comienza la expresión de proteínas virales no estructurales, bajo cuya regulación

la población celular continúa su camino con una diferenciación retrasada y muchas veces incompleta. Las proteínas virales (L1 y L2) se van expresando paralelamente a la mala diferenciación, para producir viriones en la superficie epitelial. Ante semejante replicación, uno de los mecanismos de protección como son las células presentadoras de antígenos intraepiteliales se van agotando hasta ser absolutamente insuficientes.

El tiempo transcurrido desde la infección hasta la generación de partículas infecciosas es de, al menos, tres semanas. Por lo tanto, el VPH tiene un ciclo infeccioso muy largo, sin ninguna fase de transmisión sanguínea y sin causar la muerte celular(214).

Inhibición del sistema inmune

La mayoría de las personas inmunes es capaz de eliminar la infección por VPH sin ninguna manifestación clínica, y sólo el 10% de las personas infectadas desarrollan lesiones relacionadas(212). El examen histológico de las lesiones que espontáneamente han eliminado el VPH muestra una infiltración de células T, CD4+ y CD8+; carentes en las lesiones papilomatosas persistentes(218). Esto parece estar en relación con el aumento significativo de infecciones por VPH en pacientes inmunocomprometidos, ya sean trasplantados(219) o infectados por el VIH(220). De hecho, una vez que estos individuos detienen sus medicamentos inmunosupresores o recuperan su sistema inmunológico, son capaces de eliminar la infección y las lesiones asociadas(221).

Por ello, la búsqueda de vacunas que favorezcan esta inmunidad está en desarrollo. Recientemente, estudios preclínicos han informado de que los animales inmunizados con vacunas que estimulan células T CD8+ específicas para VPH muestran una regresión de cánceres VPH dependientes(222).

Respuesta humoral

La respuesta inmune humoral generalmente es detectada por anticuerpos contra la proteína de la cápside L1, y suele ser débil, inconsistente y puede no proteger contra una reinfección futura(223). Para los serotipos de alto riesgo, la tasa de seroconversión es sólo del 30-50% después de la infección documentada(224), al igual que en pacientes con neoplasias asociadas al VPH donde se encuentran niveles detectables de anticuerpos contra la proteína L1 en el 30-50%(225). Si están presentes, los títulos de anticuerpos pueden persistir durante muchos años incluso después de que se haya eliminado la infección, por lo que la seropositividad es un marcador útil para la infección pasada que puede interferir en la valoración de la infección activa.

También se han detectado respuestas inmunes humorales a las proteínas virales E1, E2, E4, E5, E6, o E7; significativamente notables en CEOF respecto a voluntarios sanos(226, 227), por lo que se especula con el desarrollo, en un futuro, de una detección serológica del CEOF.

Respuesta celular

Es la respuesta inmunitaria mediada por células específicas contra VPH, en concreto células T CD4+ y CD8+ específicas. Estas células se coordinan para eliminar las infecciones víricas crónicas por lo

que los pacientes con evidencia de infecciones papilomatosas por VPH16 demuestran células T detectables(228).

Mecanismos virales para evadir el sistema inmune

El VPH ha desarrollado múltiples mecanismos para evadir las respuestas inmunológicas del huésped, lo que conduce al establecimiento exitoso de lesiones virales persistentes(229).

El primer mecanismo de adaptación para escapar de la vigilancia inmunológica es la coordinación de la replicación viral con la diferenciación celular. El VPH regula fuertemente su propia replicación de manera pareja a la diferenciación del queratinocito. De igual manera, evade respuestas de linfocitos T citotóxicos expresando un nivel mínimo de productos génicos virales en los queratinocitos de la capa de células basales y aumentando la expresión de productos génicos, lejos de áreas de vigilancia inmune activa. Además, el virus no causa la lisis de queratinocitos, sino que los viriones se liberan a través de la ruptura mecánica del epitelio superficial y, por tanto, minimizan cualquier respuesta inflamatoria asociada. De esta manera, la replicación del VPH es un fenómeno local con una activación inmunitaria sistémica mínima(229).

Por otro lado las proteínas virales tienen efectos inhibidores inmunitarios, generando un microambiente inmunosupresor local. Este efecto inhibitorio local sobre las citoquinas inflamatorias, amortigua la respuesta inmune innata y la adaptativa. Las proteínas E5 y E7 reducen la expresión de las moléculas del complejo de histocompatibilidad mayor de clase I, que inhiben la presentación del antígeno viral al sistema inmune(230). Por otro lado, las proteínas E6 y E7 también han demostrado reducir la expresión del receptor 9 *toll-like* y citoquinas, como las interleuquina 8 y 18, que son potentes moléculas inflamatorias.

Los interferones (IFN) son un componente clave de la respuesta del huésped a las infecciones virales. Se ha demostrado que las oncoproteínas virales E6 y E7, interfieren directamente en múltiples mediadores específicos de las vías de señalización del interferón. La proteína E7 inhibe la vía necesaria para la transcripción inducida por IFN- α (231) y afecta a la expresión IFN- γ , provocando una disminución de su producción. Dado que el IFN- γ es un componente crítico en la activación de muchos aspectos de la respuesta inmune así como un potente agente antiproliferativo, el VPH deshabilita un importante mecanismo de vigilancia de transformación oncogénica(232). Por otro lado, también se ha demostrado que la proteína E6 del VPH disminuye la expresión de IFN- β y STAT1(231). El STAT1 es un transductor de señal y factor de transcripción implicado en la regulación genética en relación directa con los IFN.

Progresión neoplásica

La integración del ADN del virus en el genoma del huésped conlleva la alteración del principal factor de transmisión/replicación viral E2, y la expresión de oncoproteínas virales E6 y E7(29, 233, 234), causantes de la inhibición de los genes supresores de tumores p53 y pRb de la célula basal (Figura 16).

La proteína E6 inhibe el gen p53 y p130. En condiciones normales, el gen p53 codifica las proteínas p21 y FAS. Por otro lado, la E7 inhibe el gen pRb, que en condiciones normales, codifica las

proteínas DEK y B-MYB. Toda ellas (p21, FAS, DEK, B-MYB) son inductoras de la apoptosis y, por tanto, inhibidoras de la inmortalidad tumoral.

Los niveles de p21 están en entredicho. En teoría, se podría esperar que la inactivación de p53 mediada por la proteína E6 cause una expresión reducida de p21. Sin embargo, hay algunos estudios que demuestran que la oncoproteína E7 provoca un aumento de los niveles de proteína p21 en queratinocitos genitales infectados por el VPH(235); por lo que su implicación real y su aplicación diagnóstica y clínica está por definir.

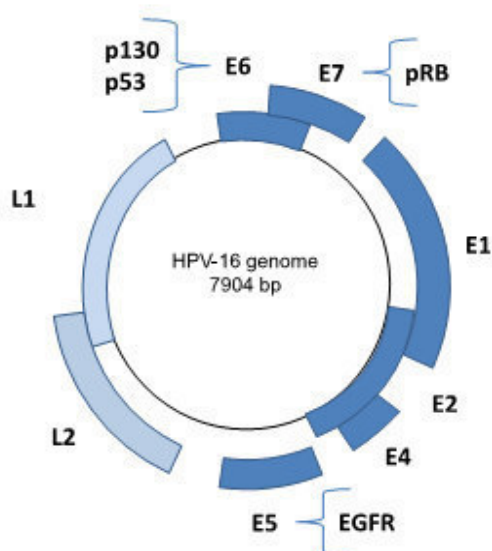


Figura 16. Relación de las proteínas fabricadas tras la integración del VPH en el genoma celular y su relación con genes supresores de tumores¹³

Por otro lado, el gen supresor tumoral p16, localizado en el cromosoma 9p21, representa un componente clave de la vía Rb, que conlleva la interacción de quinasas 4 y 6 con ciclinas de tipo D. Mantiene el gen Rb en un estado hipofosforilado que se une al factor de transcripción E2F, evitando la progresión del ciclo celular(236), es decir, inhibiendo la apoptosis. La integración del DNA de VPH-AR en el genoma del huésped se asocia con la regulación positiva del producto del gen supresor tumoral p16 y la delección del promotor del gen E2 viral, causando la transcripción de E6 y E7(237). La unión de la oncoproteína E7 a la proteína Rb conduce a la degradación de la proteína Rb y, presumiblemente, a la sobreexpresión compensatoria de proteínas p16 citoplasmáticas y nucleares en las células tumorales infectadas por VPH. Al suponer, por tanto, el pRb un regulador negativo de la proteína p16 en la fase de transcripción, se entiende que bajos niveles de la proteína pRb conlleven un incremento de los niveles del p16, típico de tumores causados por VPH(238, 239). Por otro lado, la acción de las proteínas E6 inhiben la acción apoptótica de los genes p53 y p130.

Simultáneamente, E5 regula positivamente la expresión del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), factor de crecimiento derivado de plaquetas, factor p185-neu y factor estimulante de colonias. El EGFR conduce a la represión de la expresión de p21 (inhibidor de quinasa dependiente de

¹³ Extraído con permiso editorial de Best et al. *Biology of human papillomavirus infection and immune therapy for VPH-related head and neck cancers*. Otolaryngol Clin North Am. 2012 Aug;45(4):807-22.

ciclina 1A), que como anteriormente se había explicado, es una proteína reguladora de la apoptosis y diferenciación celular.

Otros estos estudios han demostrado que la integración del VPH en el genoma del huésped conduce a una carcinogénesis independiente de la expresión de los oncogenes virales, E6 y E7, en forma de mutaciones o alteraciones genéticas como las mutaciones de PIK3CA, confirmada en carcinomas epidermoides VPH +(240, 241). Otros genes que tienen mutaciones recurrentes en pacientes con enfermedad positiva al VPH incluyen TNFR3 (factor 3 asociado al receptor de TNF) y TP63 (proteína tumoral p63)(241).

Efectos de la infección del VPH
<ul style="list-style-type: none"> • Alteración del gen de transcripción viral E2 • Represión de la inhibición del E6 y E7 viral <ul style="list-style-type: none"> ○ Sobreexpresión del E6 y E7 viral <ul style="list-style-type: none"> - Inhibición del gen supresor p53 y p130 <ul style="list-style-type: none"> ❖ Inhibición de la expresión de p21 y FAS - Inhibición del gen supresor pRb del huésped <ul style="list-style-type: none"> ❖ Sobreexpresión de proteínas DEK y B-MYB ❖ Sobreexpresión de la proteína p16 • Represión de la inhibición del E5 <ul style="list-style-type: none"> ○ Sobreexpresión del E5 viral <ul style="list-style-type: none"> - Sobreexpresión del EGFR - Inhibición de la expresión de p21

Tabla 2. Cascada de interacciones y producción proteica derivada interacción genómica del VPH

En definitiva, la modificación genética y/o la interrupción de los mecanismos celulares que regulan la apoptosis y el ciclo celular da lugar a proliferación del ciclo celular desregulada, diferenciación celular retardada, aumento de la frecuencia de mutaciones inducidas por mutagénesis y un aumento espontáneo de la inestabilidad cromosómica(232).

Métodos de detección del VPH

Debido a que el VPH no puede crecer en cultivos celulares convencionales, la identificación del virus se basa en técnicas de biología molecular. A pesar del gran número de estudios, todavía existe controversia en cuanto a qué método o combinación de métodos es el más adecuado para la identificación del VPH. Las estrategias de detección varían no sólo en el diseño, sino también en sus objetivos de detección. Estos objetivos han incluido el ADN del VPH, el ARN del VPH, las oncoproteínas virales, las proteínas celulares y los anticuerpos séricos específicos contra el virus. La detección del VPH está adquiriendo tanta importancia que ya se está implantando en los CECyC para implementar todos

los aspectos de la atención al paciente, incluido pronóstico, estadificación tumoral(50) y la selección de pacientes susceptibles de opciones terapéuticas específicas.

Existen varias metodologías disponibles para la detección de infección por VPH en tejidos y muestras de células exfoliadas. No se encuentran diferencias significativas o variación en la tasa de positividad, tanto si el estudio se realiza sobre muestras de biopsias frescas congeladas o conservadas en parafina (FFPE)(37). Sin embargo, sí parece que las muestras conservadas en parafina dificultan la determinación de la actividad transcripcional del VPH, como la detección de ARNm E6/E7(242), que es considerado el *gold standard* actual para diferenciar un VPH clínicamente relevante(242), en ausencia de sondas inmunohistoquímicas fiables para las proteínas E6 y E7. Por otro lado, según Gillison el *gold standard* para demostrar la causalidad de la oncogenicidad del VPH, al menos en CEOF, consistiría en la realización de una hibridación *in situ* ARN, análisis Northern blot y una PCR transcripcional reversa(6). Sin embargo, en un reciente metanálisis y metaregresión se postula que la variabilidad en las tasas de detección del VPH en CEL, en todo el mundo y en las series publicadas, son explicadas por el área geográfica de los estudios y no por el método de detección del VPH(30). Este hecho es muy interesante, porque en la última década se había comenzado a postular que los resultados de estudios de prevalencia en base a PCR eran irreales, si se los comparaba con un método más realista, como era la HIS(242).

Las pruebas para el VPH pueden aplicarse al sitio tumoral primario o a ganglios metastásicos. El VPH no está distribuido uniformemente en todos los subsitios anatómicos de la cabeza y cuello, estando fuertemente correlacionada con la localización orofaríngea, particularmente en amígdalas palatinas y linguales(54, 239). Por otro lado, una metástasis ganglionar resulta bastante adecuada como sustrato para la prueba de VPH, evitando la adquisición de tejido adicional en aquellos pacientes con cánceres primarios pequeños o de origen desconocido(242).

La presencia del ADN del VPH en las biopsias de los tumores no implica una relación causal suficiente. De hecho, la literatura actual reporta una prevalencia de VPH superior al 50% en los carcinomas amigdalinos(243) o, en estudios recientes en EEUU, hasta el 80% de los CEOF están relacionados con el VPH(244); donde, sin embargo, sólo alrededor del 40% de estos tumores son transcripcionalmente activos con expresión de E6 y E7 del VPH16. La importancia, por tanto, del VPH ha llegado a tal punto que incluso en la última actualización del TNM, confeccionado por la AJCC y la UICC, se ha incluido una clasificación TNM diferente para los CEOF VPH +(49).

Los métodos más comunes incluyen la detección del VPH por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), hibridación *in situ* (HIS) y detección de p16 con inmunohistoquímica. Los métodos iniciales de detección de VPH incluyeron ensayos de hibridación de ácidos nucleicos radiomarcados, como el Southern blot. Esta metodología generó información de alta calidad, pero entre las desventajas destacaban su baja sensibilidad, la necesidad de cantidades relativamente grandes de ADN purificado y procedimientos que requerían mucho tiempo (245).

Los métodos de detección deben ser precisos, técnicamente factibles y rentables para una aplicación generalizada en el ámbito clínico. Por ejemplo, la detección del ARNm E6/E7 puede ser el *gold standard* para la detección de VPH, pero la mayor demanda de experiencia y procesamiento de tejido complejo limita su aplicación como una herramienta de diagnóstico de rutina. En el otro extremo, la tinción inmunohistoquímica para proteínas virales (como por ejemplo, la p16) es relativamente simple, rápida y barata, pero el rendimiento de este enfoque ha sido demasiado inconsistente para ser utilizado como un método de detección fiable; aunque para algunos puede, en un futuro, servir como un

sustituto marcador funcionalmente relevante de la infección por VPH(34, 42, 43, 246, 247). Las técnicas basadas en la PCR son actualmente muy sensibles, específicas y ampliamente utilizadas(248). Para conocer y diferencias los métodos de detección del VPH, directos e indirectos, con sus ventajas y desventajas, son detallados en la Tabla 3:

Método de detección	Ventajas	Desventajas
Detección de ADN		
Southern Blot	Alta especificidad, capacidad de diferenciar entre el ADN episomal y el integrado en la célula huésped	No se aplica fácilmente a muestras FFPE
Reacción de cadena de la polimerasa (PCR)	Alta sensibilidad y coste-efectividad	Baja especificidad, no proporciona una medición cuantitativa de la carga viral, no hay confirmación de transcripción activa
PCR en tiempo real	Alta sensibilidad y especificidad. Capacidad de diferenciar entre episomal y ADN integrado en la célula huésped. Estimación de la carga viral	Manejo de la muestra muy complejo
Hibridación <i>in situ</i> (HIS)	Alta especificidad, capacidad de diferenciar entre el ADN episomal y el integrado en la célula huésped	Baja sensibilidad y técnicamente difícil. No da información sobre la carga viral.
Detección de ARN		
PCR transcriptasa inversa	Alta sensibilidad y especificidad	Mucho tiempo, técnicamente difícil y no aplicable a muestras FFPE
Detección de proteínas VPH		
Inmunohistoquímica E6/E7	Visualización de la expresión de las oncoproteínas virales.	Difícil de aplicar
Detección de proteínas celulares		
Inmunohistoquímica p16	Optimizada para tejidos FFPE. Alta sensibilidad y elevada correlación con la integración del VPH	Baja especificidad
Anticuerpos séricos		
Anticuerpos anti-VPH	Mínimamente invasivo sin necesidad de tejido	Marcador de la exposición acumulada al VPH. Baja sensibilidad y especificidad como biomarcador tumoral

Tabla 3. Métodos de detección del VPH y su actividad transcripcional (extraído de Robinson et al. *Refining the diagnosis of oropharyngeal squamous cell carcinoma using human papillomavirus testing. Oral Oncol* 2010;46:492-6)

Por tanto, el desafío para la comunidad oncológica es implementar pruebas estandarizadas de VPH usando un método que sea altamente preciso, técnicamente factible y rentable(242), con el objetivo de detectar de manera fiable el VPH como biomarcador válido, en el ámbito clínico, para(242):

- Discernir la presencia y el progreso de la enfermedad
- Detectar precozmente las neoplasias VPH +.
- Estadificar el tumor de manera más precisa (239)
- Seleccionar pacientes con mayor probabilidad de beneficiarse de tratamientos específicos

- Vigilar tras la aplicación del tratamiento(249).

ADN

La primera vez que se detectó el ADN del VPH 16 en el CECyC, fue en el CEOF; y se realizó mediante hibridación Southern Blot(250). Desde entonces el ADN del VPH ha sido encontrado en diversas localizaciones ORL, con unas tasas notablemente variables en función de cada estudio, método de detección y sublocalización estudiada. Esta variabilidad clásicamente estaba justificada por los diferentes métodos de detección(21, 25, 251), reconociendo que dentro de los métodos de detección de ADN, los resultados mediante HIS eran más reales que mediante PCR(242). Sin embargo, en un reciente metanálisis la variabilidad en las tasas de detección del VPH en CEL son explicadas por el área geográfica de los estudios y no por el método de detección del VPH(30).

En la actualidad, no hay un enfoque estándar para la prueba de VPH de muestras tumorales. Los métodos de prueba del VPH varían considerablemente entre los laboratorios, lo que refleja sesgos y tendencias de los investigadores, y la relación costo-beneficio de cada técnica(242). En la actualidad, la mayoría de los laboratorios de diagnóstico que realizan pruebas de rutina de muestras clínicas utilizan uno de los dos métodos para la detección del VPH, o la amplificación basada en PCR o el estudio del ADN por HIS.

Amplificación PCR

Es una técnica de amplificación diana del ADN del VPH que es capaz de amplificar secuencias genómicas en una muestra biológica que contiene tipos de células heterogéneas. Los cebadores usados pueden ser específicos para serotipos VPH individuales o una secuencia objetivo de consenso compartida por múltiples tipos de VPH.

Permite la detección sensible de un amplio espectro de genotipos pero es muy susceptible a la contaminación, generando un elevado índice de falsos positivos. Es un prueba rápida (lleva alrededor de 3 horas, a lo que hay que añadir horas de extracción del ADN celular y colocación en el gel de electroforesis), con una muy alta sensibilidad, barato y en muchas ocasiones útil a pesar de utilizar un ADN degradado.

Las desventajas de este método son la fácil contaminación con otras muestras ADN por su extrema sensibilidad (facilidad de falsos positivos) y que, previamente, deben conocerse los *primers* (oligonucleótidos que se van a amplificar) específicos para la secuencia que queramos estudiar. Además, no permite la visualización directa de la distribución tisular del virus transcripcionalmente activo.

HIS

Es una técnica de amplificación de señal que utiliza sondas de ADN marcadas complementarias a las secuencias objetivo de ADN viral. Las sondas de ADN pueden hibridarse con secuencias de ADN específicas del tipo de VPH o con una secuencia de consenso compartida por múltiples tipos de VPH o

pueden mezclarse en una única reacción para cubrir una gama extendida de tipos de VPH. El rendimiento de estas dos técnicas es comparable, aunque una comparación directa sugiere que el ISH del ADN puede ser una herramienta más práctica para fines de diagnóstico(242) que el PCR, recientemente en entredicho(30).

El desarrollo de cromógenos no fluorescentes permite ahora la visualización del ADN *in situ* en el tejido tumoral, mediante microscopía óptica convencional. La introducción de varias etapas de amplificación de señal ha mejorado significativamente la sensibilidad del HIS, incluso al nivel de detección de una copia viral por célula. Además, la adaptación de a tejidos FFPE ha hecho que esta técnica sea compatible con procedimientos estándar de procesamiento de tejidos y, en consecuencia, fácilmente aplicable en la mayoría de los laboratorios de patología quirúrgica. La visualización directa de la distribución viral en los núcleos de las células tumorales de forma más fiable, diferencia la infección de VPH biológicamente relevante del virus pasajero o, incluso, un contaminante viral.

Tiene, por tanto, una elevada sensibilidad, especificidad y resolución del análisis cromosómico. Presenta la desventaja de tener dificultades en la identificación de pequeñas mutaciones (incluidas pequeñas deleciones y mutaciones puntuales).

Actividad transcripcional

La evidencia para la activación transcripcional de las oncoproteínas víricas E6 y E7 se considera generalmente como el *gold standard* para diferenciar un VPH clínicamente relevante(242). En ausencia de sondas inmunohistoquímicas fiables para las proteínas E6 y E7, la detección del ARNm E6/E7 es la mejor opción actualmente. Hasta hace poco, la detección de la expresión de ARNm E6/E7 requería la extracción de ARN de tejidos frescos o congelados seguido de una amplificación por PCR del ARN viral, sin embargo, en los últimos años puede aplicarse a muestras FFPE. Sin embargo, la aplicación de esta técnica a muestras FFPE aunque posible, sigue siendo técnicamente difícil y su uso es muy restringido.

Además, como se explicó previamente, la infección por VPH provoca una serie de cambios en la proteinogénesis de la célula (Tabla 4), algunos de los cuales pueden ser en la actualidad cuantificados.

Efectos de la infección del VPH		Cuantificaciones estudiadas
En el virus	<ul style="list-style-type: none"> . Alteración gen transcripción E2 . Represión de la inhibición E6 y E7 . Sobreexpresión del E6 y E7 	<ul style="list-style-type: none"> . Aumento E6 y E7 . Disminución p53 y pRb . Aumento p16 . Disminución de p21 . Aumento del EGFR
En el huésped	<ul style="list-style-type: none"> . Inhibición genes supresores p53 y pRb . Aumento p16 	

Tabla 4. Efectos de la integración del ADN viral en la célula e ítems cuantificables objetivamente de dicha integración

Por tanto, sólo la demostración de la actividad transcripcional del VPH es válida para demostrar la causalidad, independientemente de la prevalencia que el virus muestre en la pieza de biopsia. La detección del ARNm E6/E7 o sus proteínas, puede ayudar a los tumores causados por el VPH. Sin embargo, esta determinación es difícil en muestras conservadas en parafina-formalina (FFPE). En un reciente metanálisis(30) se evidencia como la prevalencia del VPH en la laringe es mayor con estudios PCR (26,8%) que con estudios no-PCR, es decir transcripcionales, alcanzando el 20,3%. Este hecho puede dar idea de que la determinación del ADN del VPH puede ser insuficiente para saber la prevalencia real de un VPH activo, causando un falso positivo con VPHs *espectadores* que nada tienen que ver con la oncogénesis.

Inmunohistoquímica p16

La determinación de la expresión del p16 es un marcador razonable a tener en cuenta sobre la actividad transcripcional del VPH, distinguiendo a los tumores VPH +(34, 37, 42, 43, 246, 247), siempre que se utilice e interprete en un contexto definido que tenga en cuenta ciertos factores anatómicos, hallazgos histológicos y características de tinción(242).

Las peculiaridades sobre la técnica de detección, su asociación epidemiológica y su repercusión en la supervivencia serán detallados en el capítulo específico *Proteína de transcripción p16*.

ARNm E6/E7

Para algunos autores, la presencia de ADN de VPH o la sobreexpresión de p16 no proporcionan una evidencia suficiente de que el VPH ha contribuido al proceso oncogénico, por lo que la detección de ARN viral resulta particularmente importante(29, 33, 34). El reciente desarrollo de sondas ARN por HIS complementarias al ARNm que codifica las proteínas E6 y E7 permite la visualización directa de transcripciones virales en los tejidos rutinariamente procesados. Confirma la presencia de virus integrados y transcripcionalmente activos, permite la visualización directa de transcripciones virales en células tumorales, es técnicamente factible y ha sido fuertemente correlacionada con mejores resultados para el paciente(252).

Debe tenerse en cuenta que la determinación del ARNm puede verse afectada por los métodos de preservación de tejidos, dado que los bloques de FFPE pueden sufrir la degradación de los ácidos nucleicos durante la fijación y almacenamiento; hecho que no se tiene en cuenta en todos los estudios publicados hasta la fecha(29).

En ausencia de sondas inmunohistoquímicas fiables para las proteínas E6 y E7, la detección del ARNm E6/E7 es la mejor opción de diagnóstico transcripcional del VPH actualmente(242).

Otros marcadores

p53 y pRb

Rampias examinó el efecto de la supresión de los oncogenes E6 y E7, en líneas celulares pertenecientes a CEOF(234). Posteriormente por PCR, analizó cuantitativamente la expresión de los

genes p53 y pRb. Con la inhibición de los oncogenes E6 y E7, la expresión de las proteínas E6 y E7 se ve disminuida, y consecuentemente los niveles de su ARNm (85% menor que en el grupo control). Ello conlleva la restauración de la expresión de los genes p53 y pRb, con la consecuente sobreexpresión de los genes objetivo del p53 (p21 y FAS); además de la disminución de la expresión de aquellos genes que están sobreexpuestos en caso de ausencia funcional del pRb (DEK y B-MYB) e inducen la apoptosis de las células VPH16 +, en CEOf. Por tanto, puede resultar interesante la combinación del estudio de la presencia de VPH-ADN junto con la detección de marcadores de expresión del oncogén viral E6, patrones de mutación del gen supresor de tumores TP53 o el estudio de los niveles de pérdida alélica. Psyrri(37) evidenció una supervivencia global en los CECyC orofaríngeos VPH + y p16 +, en relación a una especial sensibilidad a la QT-RT de los *wild-type* de p53 y pRb. Este hecho era concordante con lo postulado por Kim, que relacionó la menor expresión de p53 en pacientes p16 +, con una mayor supervivencia global en CEOf sometidos a QT_i y posteriormente QT-RT(253). Del mismo modo, Bauer demostró como el estado del p53 y la expresión del Bcl-xL influyen en la respuesta *in vitro* de los CECyC al cisplatino(35).

Los estudios centrados en el CEL, no revelaron una relación entre el VPH y la sobreexpresión del p53(14, 38), sin que además el p53 supusiera un factor predictivo en la supervivencia(38, 254).

p21

Otros estudios se centran en la expresión de CDKN1A (p21) como otro marcador adicional relacionado con el VPH en el CEOf(39) y el CEL(40), siendo en ocasiones relacionada su presencia con una mejor supervivencia. En el estudio de Chernock(40) se establece por primera vez una significativa correlación entre el p21 y p16 en los tumores VPH +, asociándose además con una mejor supervivencia global. No hubo diferencias significativas en la supervivencia libre de enfermedad.

EGFR

Los tumores tabaco dependientes asocian una sobre expresión del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) mientras que los tumores asociados al VPH infraexpresan el EGFR. En el caso de los CEOf, la disminución de la expresión del EGFR, propio de los VPH, se asocia a una mejor supervivencia global de manera significativa(41, 255).

Recientemente, se ha encontrado un anticuerpo monoclonal específico contra el receptor (cetuximab), con eficacia clínica. La proteína viral E5 tiene efectos directos sobre el tráfico de EGFR en la célula, además de mejorar la activación de la vía del EGFR. Existe un ensayo clínico en curso para el cáncer orofaríngeo asociado al VPH mediante QT_i seguida de cetuximab con radiación de dosis reducida o estándar, con el objetivo de determinar si los resultados comparables para el cáncer asociado con el VPH pueden lograrse con radiación menos intensiva dirigiéndose al EGFR(256). Sin embargo, la interacción entre estos factores de riesgo no acaba de entenderse completamente.

Otros estudios se centran en marcadores como el Bcl-xL(35), EGFR(36, 41) o ERCC1(253). De igual manera, la Ciclina D1 o CCND1, se ha relacionado con el VPH en algunos estudios(13, 257), resultando en algunos, significativa en la laringe(13).

Serología VPH

Dado que las lesiones precancerosas son difíciles de detectar, los anticuerpos E6 de VPH16 están siendo sugeridos como marcadores potencialmente específicos para el cribado del CEOF VPH +. Los anticuerpos frente a la proteína E6 del VPH se detectan en la mayoría de los casos de CEOF VPH +, siendo infrecuentes en la población general(258, 259). La seroprevalencia de VPH16 E7 tiene una especificidad limitada(227, 260).

La seroprevalencia a anticuerpos VPH16 E6 se sabe que es alta entre los pacientes con cáncer orofaríngeo (rango 46%-90%)(261). Sin embargo, pocos estudios han sido capaces de explorar la seroprevalencia en los casos de cáncer antes de que fueran diagnosticados(227); uno de los cuales, analizando 135 cánceres orofaríngeos, encontró que el 35% de los casos tenían anticuerpos E6 de VPH16, detectables años antes del diagnóstico de cáncer(227).

Por otro lado, un número elevado de estudios han encontrado una correlación significativa entre resultados positivos de VPH en la biopsia y la presencia de anticuerpos frente a algún serotipo de VPH, en pacientes con CECyC(6, 8, 113, 262-266). Este hecho está especialmente estudiado en el CEOF, siendo el VPH 16 especialmente predominante frente a otros serotipos.

Otros autores postulan que la determinación de la serología del VPH16 puede llevar a confusión dado que el estado de los anticuerpos no es específico de la localización que se estudia(267). Por ello, no puede afirmarse que la seropositividad no sea debida a un contacto o a una infección en otra localización lejos de las vías aerodigestivas superiores. Además, en el caso del grupo de casos con neoplasias debidas al VPH, no puede aseverarse el desarrollo temporal de los anticuerpos debido a una lesión previa por el VPH, anterior a la neoplasia VPH +(263). Por ello, son necesarias más investigaciones para comprender mejor la sensibilidad de este marcador en personas con infección por VPH16 y su asociación con neoplasias VPH +.

Relación con el CECyC

El CECyC presenta diferentes tasas de incidencia y mortalidad en el mundo, con tasas notablemente elevadas en el sureste asiático y en Europa del este. El tabaco (fumado y masticado) y el alcohol son considerados como los factores de riesgo más importantes en el desarrollo de estos tumores. Sin embargo, a pesar de que haya habido una disminución del consumo de estas sustancias, el desarrollo de cáncer no se ha visto modificado de manera importante, comenzándose a tener en cuenta la implicación del VPH en un número no desdeñable de casos. La prevalencia del VPH es variable en función de la localización anatómica, ya sea en los CECyC, CEOF o CEL.

El papel del VPH en la patogénesis del CECyC fue sugerido por primera vez en 1983, cuando se descubrieron cambios histopatológicos compatibles con la infección por el virus en tumores orales(268). Dentro de las neoplasias de cabeza y cuello, es especialmente prevalente en aquellos pacientes que no presentan consumo de tabaco y alcohol, o presentan mayor prevalencia en fumadores y bebedores de menores cantidades(6). La presencia del VPH en el área ORL está repetidamente demostrada, pero no su relación directa con la oncogénesis de una manera pormenorizada. La detección de VPH en CECyC ha

emergido recientemente como un poderoso biomarcador, lo que indica un resultado clínico más favorable, con menor riesgo de progresión y muerte(34, 53-55, 269, 270).

El desarrollo de las vacunas antiVPH en la prevención del desarrollo del carcinoma de cérvix, ha aumentado el interés en conocer si ese modelo vacunal es aplicable a los CECyC. Cerca de 30.000 casos nuevos de carcinoma escamoso oral y orofaringe son reportados anualmente en EEUU, por lo que si solamente un tercio de los casos fueran VPH +, alrededor de 10.000 casos podrían ser prevenidos anualmente. Con un 55% de supervivencia a 5 años, una vacuna que pudiera conferir una inmunidad a largo plazo tendría un impacto sobre la salud y económico muy importante(243).

Prevalencia anatómica

	Total studies	Cases	Overall HPV DNA prevalence (95% CI)	HPV16 DNA prevalence (95% CI)
Oral cavity	72	5478	24.2% (18.7-30.2)	14.9% (11.1-19.1)
Oropharynx	53	3946	45.8% (38.9-52.9)	40.6% (34.4-47.0)
Larynx*	54	2739	22.1% (16.4-28.3)	13.4% (9.1-18.4)
Overall	148	12 163	29.5% (25.5-33.6)	21.1% (17.8-24.6)

HPV=human papillomavirus. *Including hypopharynx cases.

Table 1: HPV DNA prevalence in head and neck squamous cell carcinoma by anatomical site

Figura 17. Prevalencia global del VPH en CECyC¹⁴

La distribución de los CECyC puede provocar una clasificación errónea de los subsitios anatómicos implicados en cada carcinoma epidermoide estudiado. En estadios avanzados, de hecho, el origen tumoral puede ser difícil de valorar, influyendo en el resultado final del estudio de prevalencia por sublocalización. Por ello, la clasificación errónea del sitio tumoral podría ser un importante factor explicativo de parte de la heterogeneidad observada en distintos estudios y regiones anatómicas(29).

En un reciente metanálisis, se estima al VPH como causante del CEOF en 45,8% de los casos, por encima de revisiones previas(26, 271). En menor proporción es causante del 20,2-24,2% de los CECyC o el 22,1% de los CEL(27, 29), incluyendo en este último caso, los tumores de la hipofaringe(29) (Figura 17). La inclusión de series que añaden estudios inmunohistoquímica p16 ha resultado en una menor proporción de los CECyC VPH +, alcanzando tasas del 6,8% (CECo), 35,6% (de CEOF) y 19,1% (CEL)(26).

Algunos autores no aceptan la presencia del VPH sin la presencia del ARNm E6/E7 y/o la positividad al p16(272). Sin embargo, muy pocas series estudiaron biomarcadores adicionales en las sublocalizaciones de la cabeza y cuello, lo que demuestra la necesidad de determinar con mayor precisión la fracción de CECyC atribuible al VPH, mediante con procedimientos estandarizados. Con la inclusión del ARNm E6/E7 las estimaciones fueron de 16,3% (CECo), 40% (CEO) y 8,6% (CEL)(29). Sin embargo, existe la sospecha de que exista un sesgo de selección en estas series, aumentando el número

¹⁴ Extraído con permiso de Elsevier Ltd/The Lancet Oncology de Ndiaye C. et al. *VPH ADN, E6/E7 mRNA, and p16INK4a detection in head and neck cancers: a systematic review and meta-analysis*. Lancet Oncol. 2014 Nov;15(12):1319-31.

de casos positivos al ADN, en relación con el tipo de casos examinados para los biomarcadores adicionales, considerándose estos datos débiles e imprecisos(29). Además, la sensibilidad de la prueba del ARNm E6/E7 podría verse afectada por los métodos de preservación de tejidos utilizados, dado que los bloques de FFPE pueden sufrir la degradación de los ácidos nucleicos durante la fijación y almacenamiento; hecho que no se tiene en cuenta en todos los estudios publicados hasta la fecha(29).

Concretamente en el caso del CEL, con o sin biomarcadores (p16 o ARNm E6/E7), se estima en metanálisis una prevalencia del 22,1-27,9%(26, 27, 29, 30); con algunas series centradas únicamente en laringe, con un número interesante de casos(12, 14-20, 22-25). El principal sesgo de selección de las muestras de laringe es que, en muchos casos, se incluyen datos de tumores hipofaríngeos(26, 29), sin poder extraer de manera unitario los datos únicamente laríngeos.

Está confirmado, por distintos metanálisis y metaregresiones que existe una tendencia creciente en la incidencia del CEOF VPH +, con un aumento a lo largo del tiempo(4, 29, 110, 113, 270, 271), con un aumento de la proporción de los pacientes jóvenes que padecen CEOF (29, 107, 110), atribuido en un principio a la variación de las conductas sexuales, con mayor tendencia al sexo oro-genital u oro-anal. Sin embargo, la causa sexual ha sido desmentida en un reciente metanálisis(10) donde se postula que dicha asociación entre el comportamiento sexual y el CECyC podría atribuirse lo confuso de los hábitos sociodemográficos y de comportamiento sexual, más que a un efecto etiológico del VPH.

Por otro lado, es de destacar que el aumento de prevalencia observado a lo largo del tiempo en el CEOF, no se observó en los CECyC o CEL(29, 271).

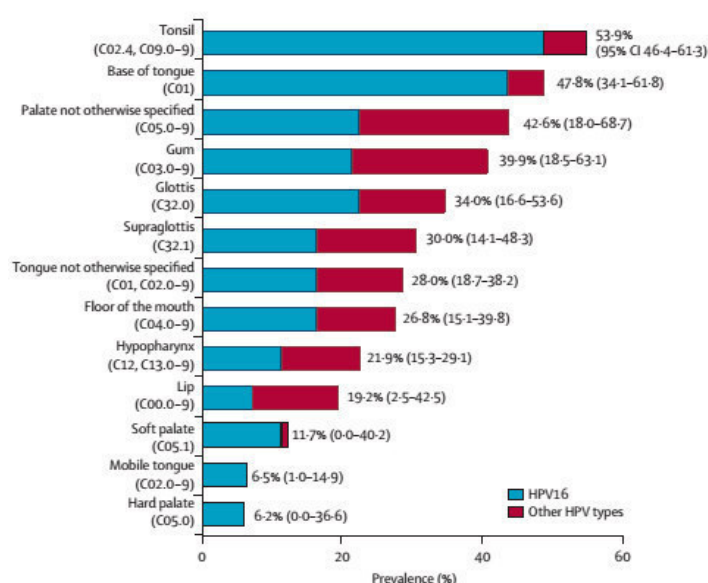


Figura 18. Prevalencia del VPH16 vs. Otros serotipos, distribuido por sublocalizaciones anatómicas¹⁵

El CEOF es la localización de cabeza y cuello con mayor proporción de CE VPH +, alcanzando unos índices del 45-50%(26, 29, 271). Las amígdalas y la base de la lengua tienen la mayor prevalencia

¹⁵ Extraído con permiso de Elsevier Ltd/The Lancet Oncology de Ndiaye C. et al. *VPH ADN, E6/E7 mRNA, and p16INK4a detection in head and neck cancers: a systematic review and meta-analysis*. Lancet Oncol. 2015 Jun;16(6):e262

de VPH(54, 262, 273), en particular por la infección por VPH16(29) (Figura 18). La complicada yuxtaposición del epitelio escamoso y del tejido linfático en las amígdalas palatinas parece compartir propiedades con la unión escamosocolumnar del cérvix uterino, donde se generan la mayoría de los cánceres del tracto genital femenino a pesar de la omnipresencia del VPH en la vagina y vulva. La prevalencia del VPH en el paladar blando parece ser baja. Sin embargo, esta estimación se cree sesgada por una clasificación nominal del paladar errónea o poco concreta(29).

El estudio de la evolución temporal, reveló un aumento no significativo de la prevalencia general del ADN del VPH en hombres en CEOF América del Norte(29), de acuerdo con estudios que estiman una mayor prevalencia del VPH oral en hombres de una población sana de América del Norte(213).

Prevalencia geográfica

Recientemente se ha confirmado una menor prevalencia del CEOF VPH en Europa que en Norteamérica(29), en contraposición a los datos extraídos por Kreimer en 2005(26) u autores que no encuentran diferencias significativas en la distribución geográfica del VPH en Europa(273). En las revisiones publicadas, algunas regiones como África u Oceanía siguen siendo insuficientemente representadas por carecer de un número significativo de estudios(29).

Se detectó más CECyC y CEL en América, del Sur y Central, y Asia, que en América del Norte y Europa. En el caso del CECyC esta diferencia geográfica es significativa para algunos autores(29), mientras que para otros no lo es(27).

En el caso del CEL la valoración de la diferencia geográfica es homogénea entre diferentes estudios, postulando que no existe una diferencia geográfica en la implicación del VPH en el CEL(26, 27, 29).

Serotipos VPH implicados

El VPH16 es notablemente el serotipo más frecuentemente encontrado llegando a representar más del 80% de todos los CECyC VPH +(26, 27, 29, 54, 271), cuyo papel oncológico está sobradamente demostrado por la IARC(63). La mayor contribución relativa del VPH16 se observó en CEOF, siendo también el serotipo más frecuente en CECyC y CEL (Figura 19).

El segundo tipo más común de VPH-AR es el VPH18, que se puede llegar a detectar en el 2,5% de todos los pacientes con CECyC(29).

Los serotipos VPH16 y VPH18 son los más frecuentes en todas las sublocalizaciones de la cabeza y cuello, contribuyendo, relativamente, al 89,9% del total de todos los casos positivos al ADN de VPH de los CECyC. Por ello, es correcto pensar que las vacunas actuales de VPH, dirigidas a VPH16 y VPH18, entre otros, son potencialmente eficaces en la prevención del 23,6% de todos los casos de carcinoma de CECyC.

La prevalencia de tipos de VPH distintos de VPH16 o VPH18 parece incrementarse en sitios no orofaríngeos(29, 274), sin todavía poderse explicar este hecho. La variabilidad podría deberse a diferencias en el tropismo tisular del tipo VPH o en diferentes perfiles inmunológicos de cada sublocalización anatómica. Otros serotipos conocidos como oncogénicos previamente detectados en biopsias de carcinomas de cérvix (-31, -33, -35, -45, -56, -58, -59) no son habitualmente detectados en CECyC.

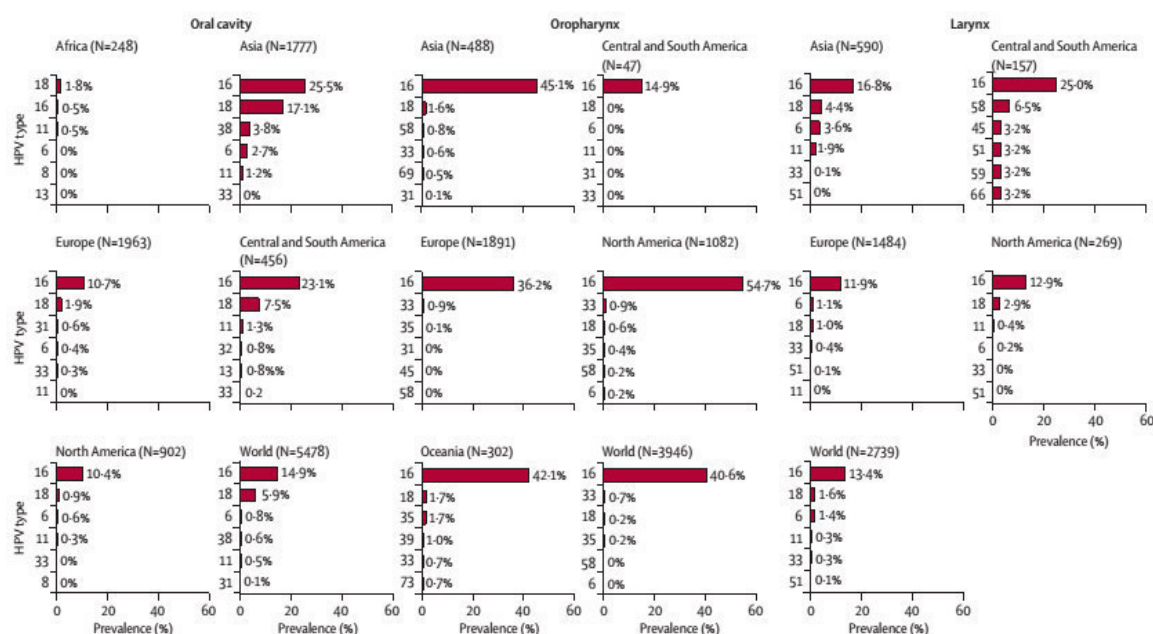


Figura 19. Prevalencia global de VPH distribuido por geografía, localización anatómica y porcentaje de serotipos en CECyC¹⁶

En el CECyC el VPH18 se encontró en un bajo porcentaje, en algunos de los cuales coexistió con el VPH16(27). Otros subtipos menos frecuentemente encontrados fueron el VPH8, VPH31, VPH38 y VPH66, mientras que los VPH de bajo riesgo son aún más raramente encontrados, siendo considerados casi como artefactos(275).

El CEL, mucho menos estudiado que los CECyC o CEOF, presenta una mayor diversidad de serotipos de VPH otros tipos de VPH incluyendo el VPH18, VPH26, VPH31, VPH33, VPH39, VPH36, VPH45, VPH51, VPH52, VPH58, VPH59, VPH66 y VPH69(17, 19, 27, 32, 36, 43, 276). El VPH de bajo riesgo es detectado de manera inusual, siendo considerado en la mayoría de los casos como una incidencia(27).

La proporción de casos con múltiples infecciones por VPH se estima cercana al 1,1%(29), diez veces menor que en el cáncer cervical (11,2%)(277). Esta diferencia podría explicarse por el aumento de la exposición del cuello uterino al VPH.

¹⁶ Extraído con permiso de Elsevier Ltd/The Lancet Oncology de Ndiaye C. et al. *VPH ADN, E6/E7 mRNA, and p16INK4a detection in head and neck cancers: a systematic review and meta-analysis*. Lancet Oncol. 2014 Nov;15(12):1319-31.

Características de los tumores causados por VPH

El papel de covariables como la edad, sexo, consumo de alcohol o tabaco, región geográfica, momento del diagnóstico, métodos de PCR, tamaño del estudio, preservación de las muestras y la calidad de los artículos ha sido recientemente analizado a través de un análisis multivariante y una metaregresión. De todas las covariables exploradas, sólo el tiempo de diagnóstico y la región geográfica se han identificado como estadísticamente significativas(29), de acuerdo con otros metanálisis que confirmaban que los métodos de detección no influían en la prevalencia global del VPH en CECyC, que estaba significativamente influenciada por la distribución geográfica de los estudios(30). No obstante, la posible relación con el tabaco y el alcohol, es cuestionable porque existe una excesiva heterogeneidad en los estudios sobre la clasificación del tabaquismo y alcoholismo. Si los estudios no categorizan el tabaquismo o el consumo de alcohol de la misma manera y con el mismo nivel de detalle, el poder de la meta-regresión simple está restringido y la prevalencia real está afectada(29). Para obtener estimaciones globales robustas sobre el verdadero papel de los factores de riesgo de los carcinomas de CECyC distintos de la infección por VPH, son necesarios indicadores estandarizados (por ejemplo, paquetes fumados/año).

Edad de aparición

Recientes metanálisis confirman que los CECyC se presentan en población más joven confirmando postuladores previos(41, 55, 270, 278). Algunos autores relacionan la edad con la promiscuidad, evidenciando como los pacientes más jóvenes (<55 años), con 4 o más parejas sexuales eran 4,4 veces más propensos a tener los tipos de VPH de alto riesgo(113).

Datos raciales y sexo

Las estimaciones de prevalencia del VPH en CEOF en los Estados Unidos se han basado en poblaciones de estudio compuestas principalmente por hombres blancos(8, 110). Entre 1995 y 2012, la proporción de CEOF causados por VPH aumentó entre todos los grupos de sexo y raza(279).

Se ha evidenciado un pronunciado aumento en la proporción de casos de CEOF causados por el VPH en mujeres y población no blanca en las últimas dos décadas(279). No obstante, en las últimas series se había venido demostrando consistentemente como los hombres tienen una prevalencia mayor de CEOF VPH +, que las mujeres(110, 280). Sin embargo, estos datos son controvertidos. En un reciente metanálisis se postula que, a pesar de las distintas tendencias de incidencia por sexo, en EEUU la prevalencia de VPH en el CECyC es comparable entre hombres y mujeres(29, 279), con un aumento significativo en la prevalencia del VPH en el CEOF, en mujeres, en las últimas dos décadas. Por otro lado, los datos europeos reportan una gran proporción de CEOF VPH + en mujeres, aunque, en este caso, eran más prevalente en mujeres que en hombres(281). Sin embargo, los hombres siguen teniendo el doble de incidencia de CECyC que las mujeres(29).

Existen muy pocas series que relacionen el VPH con poblaciones no blancas, como la negra (110, 282, 283), o las poblaciones asiáticas y/o hispanas(284). En un reciente estudio con 863 pacientes, se postula que el CEOF VPH + es menor en la población negra, siendo similar en los blancos, asiáticos e hispanos(279).

Por otro lado, la incidencia de CECyC es mayor en las mujeres con un carcinoma de cérvix (99% de los cuales está vinculado al VPH) que en la población general o en mujeres con otro tipo de tumores(285).

Relación con tabaco y/o alcohol

La posible relación con el tabaco y el alcohol, es cuestionable porque existe una excesiva heterogeneidad en los estudios acerca de cómo clasificar el tabaquismo y el alcoholismo, por lo que la prevalencia ajustada es probablemente errónea(29, 286). Además, los estudios al respecto aportan datos muestrales limitados y una débil evidencia estadística(286).

Algunos autores creen plausible la asociación positiva entre el tabaquismo y el VPH, dada la naturaleza transitoria de la infección, y la probable necesidad de un factor contribuyente que promueva la oncogénesis(287, 288). De hecho, el tabaco se ha relacionado potencialmente con todas las fases principales de la carcinogénesis relacionada con el VPH. Histopatológicamente, el tabaquismo causa alteraciones celulares y estructurales en las amígdalas, que favorecen la adquisición de VPH(289), confirmado con una alta prevalencia de la infección por VPH en los fumadores activos(111, 290). De tal manera, que los fumadores activos tienen de manera significativa mayores cargas virales que los nunca fumadores. Esto implica que el cese del hábito tabáquico podría dar lugar a la atenuación de la carga viral(290).

Por otro lado, una vez conocido la capacidad del tabaco para suprimir el sistema inmune, facilita que la infección del VPH se perpetúe favoreciendo su deriva oncogénica(288, 291), además de mermar la capacidad innata celular antioncogénica a través de mutaciones del p53. Adicionalmente, se ha postulado que las alteraciones genéticas o epigenéticas asociadas con el tabaco dan como resultado una aceleración de la progresión de la enfermedad en individuos infectados por el VPH(39, 292), apoyado clínicamente con la evidencia de que los pacientes fumadores con CECyC VPH + presentan una menor supervivencia que los pacientes no fumadores(39, 292, 293).

Sin embargo, otros autores postulan que los factores de riesgo que se relacionan con los tumores asociados al VPH, difieren de los clásicos encontrados en los VPH -. Los carcinomas orofaríngeos asociados al VPH parecen ocurrir en menor medida en grandes bebedores y fumadores habituales(294). Applebaum(5) postuló que la seropositividad al VPH16 aumentaba x10 el riesgo de desarrollo neoplásico faríngeo, más aún en bebedores de menos de tres bebidas a la semana o no fumadores, en los cuales se incrementaba a x30. Otros confirmaron lo anterior, objetivando que los pacientes con tumores VPH + eran significativamente menos fumadores que los VPH - (55). Esto es confirmado por otros autores que encuentran que los CECyC VPH + se dan significativamente en población más joven, con menor exposición al tabaquismo y al alcohol(278), presentando una mayor supervivencia global y libre de enfermedad(295).

En el caso concreto de los CEL, la serie publicada con mayor número de pacientes, la de Xu(25), reveló que el CEL VPH + es más frecuente entre los no fumadores ($p<0,05$), no bebedores ($p<0,05$) y en tumores supraglotis ($p<0,05$).

Histología

Algunos autores encuentran una mayor diferenciación de los tumores VPH + hacia formas pobremente diferenciadas o de características basaloideas(54, 296) o verrucosas(297).

El carcinoma basaloide es una variante rara, que supone el 5% de todos los CEs. Se diagnostica a partir de los criterios de Wain (palidez periférica, asociación con el carcinoma epidermoide, alta relación citoplasmática nuclear, alta tasa mitótica y crecimiento sólido), posee positividad para la tinción anti-34BE12 y CK 5/6 y tiene una ausencia de marcadores neuroendocrinos. Su incidencia creciente resulta paralela a la de los tumores positivos al VPH, sobre todo en la orofaríngea(296). Es frecuentemente considerado un carcinoma de alto grado, con peor pronóstico que otros CE, debido a una mayor tasa de metástasis a distancia. Sin embargo, BSCC tiene tasas de control locorregional similares o mejores, y una radiosensibilidad relativamente mejor que el CE. El VPH es probable que sea un importante factor pronóstico y predictivo, pero queda pendiente establecerlo.

El carcinoma verrucoso es una rara variante de CE bien diferenciado. Se presenta con mayor frecuencia en la mucosa de la cabeza y el cuello, predominantemente en la cavidad oral y en la laringe, pero también puede surgir en otros lugares, como la piel, la región anogenital, la vejiga urinaria y el esófago. Crece lentamente y aunque es localmente destructivo, se cree que es incapaz de metastatizar. El pronóstico es, por tanto, significativamente mejor que el carcinoma epidermoide. La participación del VPH en la patogénesis del carcinoma verrucoso es controvertida, postulada por algunos autores(297). Sin embargo, en recientes estudios pormenorizados, confirmados con biomarcadores (p16 y ARNm E6/E7) se descarta esta posibilidad(298, 299).

Transmisión sexual

Está confirmado, por distintos metanálisis y metaregresiones que existe una tendencia creciente en la incidencia del CEOF VPH asociados, con un aumento a lo largo del tiempo(4, 29, 271), con un aumento de la proporción de los pacientes jóvenes que padecen CEOF (29, 107, 110), atribuido en un principio a la variación de las conductas sexuales, con mayor tendencia al sexo orogenital u oroanal. Estos datos pueden explicarse por cambios en los hábitos sexuales en dicho periodo con aumento paralelo subsecuente de la transmisión de otros patógenos de transmisión venérea, como el VPH(8), demostrado indirectamente por el aumento de la seroprevalencia del VHS. Específicamente el VHS tipo 2 ha aumentado su seroprevalencia en EEUU un 30% entre los periodos 1976-1980 y 1988-1994.; hecho más pronunciado en los pacientes jóvenes(300).

Como ha sido reflejado en otros estudios, la infección oral por VPH se da por vía sexual. Una vez ajustado con el consumo de tabaco y alcohol, se ha demostrado un incremento en la tasa de desarrollo de carcinoma epidermoide orofaríngeo VPH + en(8, 115):

- Individuos con historia de cánceres anogenitales asociados a VPH.
- Mujeres con un carcinoma de cérvix(285).
- Maridos de mujeres con cánceres cervicales in situ o invasivos.

Estudios previos encontraron una relación significativa entre el número de parejas sexuales y la realización de sexo oral-genital, con el desarrollo de CEOF(112). De este modo, los pacientes con CEOF presentaron, en promedio, un número mayor de parejas sexuales a lo largo de su vida. Además el número de parejas a lo largo de la vida incrementaba el riesgo de contraer un CEOF. De este modo, aquellos pacientes que reconocían 2-4 parejas presentaban un OR 14,7; de 5 a 9 parejas un OR de 19,1; y aquellos con más de 9 pareja sexuales en su vida, presentaban un OR 34,2. Del mismo modo si reconocían más de 4 parejas sexuales con quienes habían practicado sexo oral, presentaron un 16.

Por otro lado, la edad parece ser un factor que favorece la transmisión del VPH. De hecho, Smith(113) postula que los pacientes más jóvenes (<55 años), con 4 o más parejas sexuales eran 4,4 veces más propensos a tener los tipos de VPH de alto riesgo al igual que los pacientes de edad avanzada (> 55 años) con 3 o menos parejas sexuales. Lamentablemente, en la actualidad, no se dispone de estudios que relacionen la información de índole sexual con el CEL.

Sin embargo, en un reciente metanálisis(10) se postula que dicha asociación entre el comportamiento sexual y el CECyC podría atribuirse lo confuso de los hábitos sociodemográficos y de índole sexual, más que a un efecto etiológico del VPH. No obstante, según lo postulado por algunos autores, la información sexual constituye una información que, pese a lo embarazoso que resulta para el médico y para el paciente, puede resultar muy interesante y suponer un dato más a la hora de la toma de decisiones sobre el tratamiento a prescribir y el seguimiento a realizar.

Respuesta a tratamiento y Supervivencia asociada

La extracción de datos objetivos sobre supervivencia es muy complicado. En general los resultados publicados corresponden a grupos heterogéneos de series que incluyen estudios observacionales, prospectivos y, sobre todo, retrospectivos no randomizados. La mayoría de los estudios incluyen cohortes tratados con una sola modalidad (cirugía primaria o radioterapia primaria) y con variabilidad en la forma de medición de la supervivencia. Incluso, algunos no especifican las modalidades de tratamiento, obteniendo tasas de supervivencias independientes a la terapéutica utilizada(51, 301). En este tipo de estudios, se confirmaba que los pacientes con CECyC VPH + presentaban una mejor supervivencia global y menores tasas de eventos adversos(51-54), independientemente del régimen de tratamiento al que se les sometía (RT, QT o cirugía), con un HR de 0,25-0,42 para los VPH +(51, 53).

Recientemente D'Souza postulaba que para considerar un tumor causado por VPH, debía de existir positividad al ADN del VPH y a la p16. De este modo, los CEOF VPH+/p16+ presentaron un riesgo no significativo de muerte menor (HR=0,25), de manera similar a estudios previos en la orofaringe(37, 45, 302, 303) o en hipofaringe(304). De hecho Psyrrí establece que la presencia de los *wild type* p53 y pRb en los tumores VPH+/p16+ podría contribuir a una mejor supervivencia global y libre de enfermedad, por una especial sensibilidad a la quimio radioterapia de este subgrupo de tumores(37). En el estudio de Kumar(41) por primera vez, demostraron de que el número de copias del VPH estaba significativamente asociado con la respuesta a la terapia de preservación de órganos, incluyendo a la QT i y QT; aunque el número de pacientes en nuestra cohorte era pequeño (n=42).

Cuando D'Souza estudiaba la supervivencia asociada al VPH, al p16 o ambos, objetivó que resultados eran similares con el p16 ($HR=0,32$) o solamente con la positividad del ADN VPH16 ($HR=0,36$), por lo que extrapoló que el p16 es un adecuado biomarcador de oncogénesis y predictor de supervivencia en el CEOF, al igual que lo postulado por otros autores(42, 45, 52, 53, 246, 247, 281) . Sin embargo, el p16 no era útil como biomarcador ni predictor de supervivencia en zonas no orofaríngeas (Figura 20) como el CEL(47, 305) o el CE de hipofaringe(305), donde según algunos autores el p16 y/o VPH no son predictores de la supervivencia.

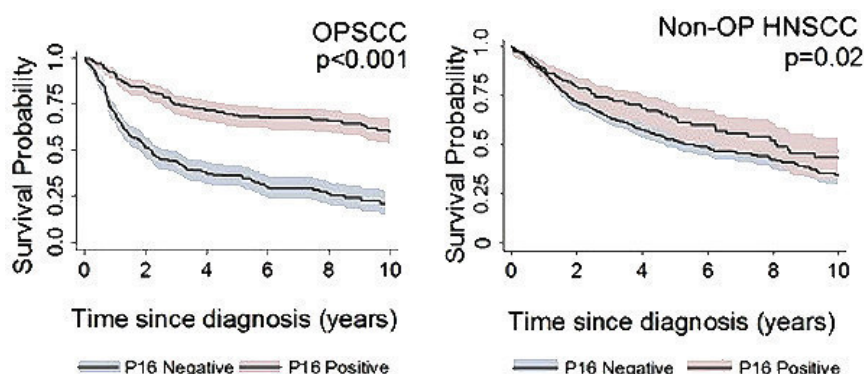


Figura 20. Curvas de Kaplan-Meier de la supervivencia global en CEOF (OPSCC) o carcinomas epidermoides no orofaríngeos (Non-OP HNSCC), en función de la presencia de p16¹⁷

En los últimos años se han impuesto, dentro de los protocolos de conservación de órganos, terapias secuenciales o escalonadas. Este hecho, a parte de la organopreservación, busca obtener resultados excelentes con dosis más bajas y toxicidad disminuida. Los estudios que llevan a cabo esta modalidad de tratamiento y que además estudian sus resultados, ponderados a la presencia e implicación del VPH, son cada vez más habituales. Una revisión reciente reveló que los CEOF VPH + presentaban mejor pronóstico que los cánceres de VPH -, cuando se trataban con radiación, ya sea sola o con quimioterapia concomitante(306).

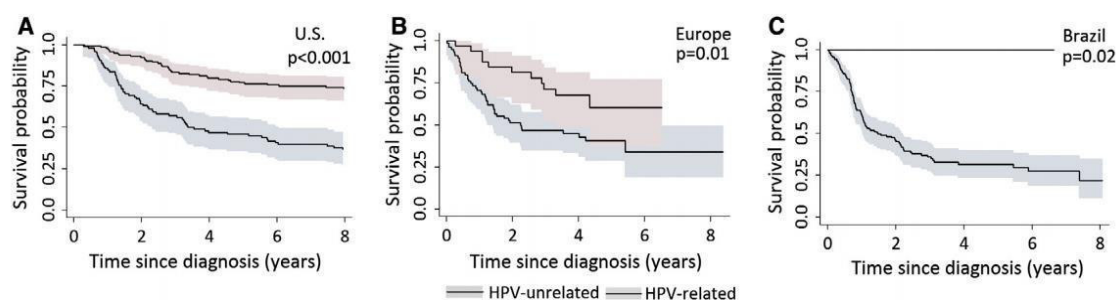


Figura 21. Curvas de Kaplan-Meier de la supervivencia global en el CECyC en EEUU, Europa y Brasil¹⁸

¹⁷ Extraído con permiso editorial de D'Souza et al. *Effect of VPH on head and neck cancer patient survival, by region and tumor site: A comparison of 1362 cases across three continents*. Oral Oncol. 2016 Nov;62:20-27 (Supplementary material)

¹⁸ Extraído con permiso editorial de D'Souza et al. *Effect of VPH on head and neck cancer patient survival, by region and tumor site: A comparison of 1362 cases across three continents*. Oral Oncol. 2016 Nov;62:20-27

La supervivencia global a 3 años fue significativamente mayor en los CECyC VPH + (82% VPH +, frente a 45% en VPH -). Esta reducción en el riesgo de muerte entre los casos de CEOF relacionados con el VPH fue consistentemente observada en EEUU ($p<0,001$), Europa ($p=0,01$) y Brasil ($p=0,02$)(53). Después de ajustar la mortalidad al VPH, edad, estadio tumoral, sexo, tabaco y consumo de alcohol, el riesgo de muerte fue similar en Europa y los Estados Unidos, pero era elevado en los casos en Brasil (Figura 21).

Comparando la presencia del VPH con el tabaquismo (Figura 22), de manera significativa, se evidenció como el grupo de los VPH - y fumadores, presentaban la peor tasa de supervivencia; al contrario que los VPH + y nunca fumadores, que presentaban notablemente mejor supervivencia a 10 años(53). No obstante, la información sobre el consumo de tabaco y alcohol en cada estudio se recoge de manera diferente, con poca homogeneidad en los instrumentos y los cuestionarios, lo que dificulta la extracción de datos(53).

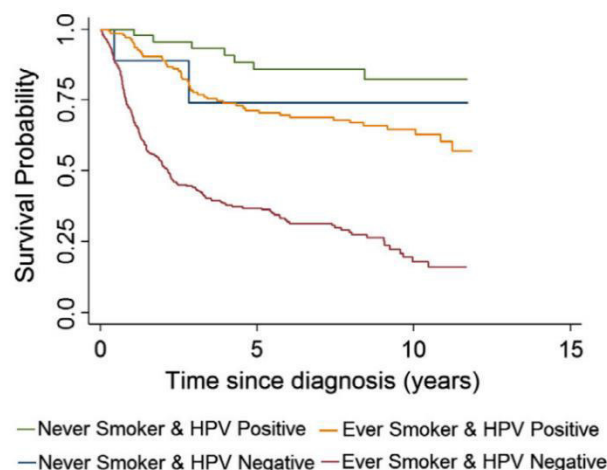


Figura 22. Curvas de Kaplan-Meier de la supervivencia global en el CECyC en función del tabaquismo y presencia del VPH¹⁹

Por otro lado, se valoró la influencia de otros factores como el estadio tumoral, la edad y el tabaquismo en forma de paquetes/año, observando que en todos ellos, de manera significativa, la supervivencia estratificada era menor en los VPH -(53).

Cuando los resultados se estratifican por tratamiento, se evidencia mejores resultados en los CE p16 + tratados con terapia quirúrgica primaria en lugar de radioterapia primaria, de manera significativa(52). Sin embargo, no hubo diferencias estadísticamente significativas entre la radiación primaria versus tratamiento quirúrgico, en los CECyC VPH -(52). Los datos demuestran que los pacientes con cáncer p16 + tuvieron un peor resultado con radiación, excepto para los tumores T3 o T4, que respondían mejor a la radiación. En general, en la mayoría de los estudios, no existe una distinción entre los estadios IVA, IVB y IVC o las diferentes modalidades aplicadas a cada uno de ellos, por lo que no puede excluirse que parte de la variación en la supervivencia se explique por las diferencias en la proporción de

¹⁹ Extraído con permiso editorial de D'Souza et al. *Effect of VPH on head and neck cancer patient survival, by region and tumor site: A comparison of 1362 cases across three continents*. Oral Oncol. 2016 Nov;62:20-27

cánceres en estadio IVC y / o en los tratamientos establecidos(53). Por otro lado, en la serie de Lassen se establece que la relación del VPH con el p16 parece suponer un factor de buen pronóstico, obteniendo mejores resultados en pacientes con CECyC tratados solamente con RT; mejorando significativamente el control locoregional, la supervivencia libre de enfermedad y la supervivencia global(307).

En el caso de los CECyC de origen no orofaríngeo (cavidad oral y laringe, principalmente), la utilidad predictiva de VPH16 y p16 resultó menos clara que en los CEOf. El análisis univariante sí que revela un riesgo de muerte significativamente menor de muerte en los VPH + (HR=0,55), en EE.UU. (HR = 0,61) y Europa (HR = 0,56)(279). Cuando se consideró sólo el estado del tumor p16, se atenuó el efecto sobre la supervivencia y al considerar solamente el ADN del tumor VPH16 no se encontró una asociación estadísticamente significativa. Después del ajuste para otros factores de riesgo (edad, estadio tumoral o tabaco) ni el p16 ni el ADN del VPH16 fue un predictor significativo del riesgo de muerte(53), congruente con estudios previos(47, 305) (Figura 23).

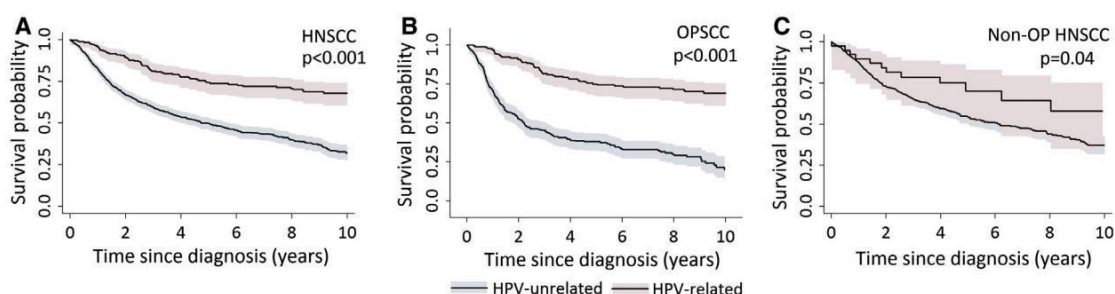


Figura 23. Curvas de Kaplan-Meier de la supervivencia global en el CECyC comparada entre CECyC globalmente, CEOf y CE de origen no orofaríngeo, en función de la presencia del VPH²⁰

De manera no significativa, el riesgo de muerte se redujo en neoplasias VPH16+ y p16+ (aHR=0,59). Comparando los subsitios anatómicos, los pacientes con tumor laríngeo sitio tenía significativamente menor riesgo de muerte en comparación con aquellos con CECyC (aHR=0,72)(53).

El riesgo de recidiva fue menor en el CEOf VPH + (recidiva a 2 años 12% vs 32%, recidiva a 5 años 15% vs 36%, $p = 0,01$) y la supervivencia libre de enfermedad fue también menor en los VPH + (88% frente a 66%, $p = 0,01$, HR=0,53)(53), congruente con estudios previos(37). Sin embargo, estos datos pueden verse influenciados por el hecho de que muchas publicaciones de EEUU no incluyen datos exhaustivos de recidiva. El riesgo de recidiva en los CECyC de origen no orofaríngeo fue menos clara, sin poder extraer datos significativos.

²⁰ Extraído con permiso editorial de D'Souza et al. *Effect of VPH on head and neck cancer patient survival, by region and tumor site: A comparison of 1362 cases across three continents*. Oral Oncol. 2016 Nov;62:20-27

Relación con la laringe

Neoplasias benignas

Uno de los primeros autores en valorar la presencia del VPH en laringe, en ausencia de patología tumoral evidente, fue Brandsma en 1989(308), objetivando que el 4% de los pacientes estudiados presentaban positividad al VPH sin alteraciones sintomatológicas ni en la exploración. Estudios más modernos centrados en laringes no patológicas (en base a autopsias o cepillado laríngeo) detectaban una media ponderada de VPH de 9,6%(27).

Por otro lado, muy pocos estudios han examinado la tasa de detección del VPH en otras lesiones benignas de la laringe, excluyendo a la papilomatosis laríngea recurrente. Rihkanen(309) estudió 32 pacientes sometidos a microcirugía laríngea por laringitis crónica y por pólipos/nódulos vocales, con 19% de presencia de VPH. Posteriormente, Morshed(19) no encontró ningún VPH en 22 nódulos de cuerdas vocales. Smith(310) lo detectó en el 30% de las leucoplasias laríngeas estudiadas.

Papilomatosis Laríngea Recurrente

Englobada dentro de la papilomatosis recurrente respiratoria, es una entidad infecciosa por VPH que afecta a la laringe, tráquea y pulmones; además de otras mucosas del tracto respiratorio(311). Concretamente, la papilomatosis laríngea recurrente (PRL) es el tumor benigno de la laringe más frecuente en la edad infantil, también presente en adultos. Puede poner en peligro el pronóstico vital por obstrucción de las vías aéreas respiratorias o por posible malignización de las lesiones.

La asociación de VPH6 y VPH11 con la PLR está bien establecida(215), sin embargo, no es fácil establecer a la relación entre la papilomatosis y la malignización a carcinoma epidermoide. En ciertos casos, esta malignización en los pacientes con PLR ha sido descrita como muy precoz y sin otros factores predisponente conocido del CEL, como el hábito tabáquico.

Su incidencia se estima en 1500-2500 nuevos casos al año en EEUU(215). En la población infantil no parece haber diferencias entre los niños y las niñas, pero en los adultos se observa un predominio masculino. Aunque existen algunos casos de comienzo neonatal, parece existir una distribución bimodal de la edad de aparición de los primeros síntomas, con división casi equitativa de los casos(312):

- Infantil: 2-5 años, sin diferencias por género. Es más común y más agresiva.
- Adulta: 20-40 años, con mayor predominancia en hombres (4:1).

Se postula desde hace tiempo la hipótesis de la contaminación infantil por condilomas acuminados del cuello de útero durante la gestación o el parto, ya que la aparición habitual de la papilomatosis laríngea se suele dar en la primera infancia. Por ello, en casos de mujeres con grandes condilomas acuminados que ocupan el canal del parto, se recomienda la realización de una cesárea para disminuir el riesgo de transmisión perinatal(217). Por otro lado, se ha demostrado la posible transmisión del VPH por vía trasplacentaria, al detectarse ADN del VPH en sangre del cordón umbilical de niños

nacidos de madres con condilomas asintomáticos así como de líquido amniótico de madres infectadas(262). Sin embargo, los condilomas son infinitamente más frecuentes que la papilomatosis laríngea por lo que esta discrepancia se ha intentado explicar por el paso de anticuerpos maternos frente al VPH de los condilomas, por vía trasplacentaria(313).

La evolución de la papilomatosis laríngea es imprevisible y desconcertante. Puede producirse una remisión o puede sufrir una reactivación después de años de la remisión, razón por la que es difícil asegurar el término de *remisión completa*. Las recidivas son muy frecuentes, distinguiéndose formas benignas y malignas en función de la frecuencia y extensión implicada en la reaparición. La transformación maligna a un CEL no es fácil de establecer, aunque se habla de un riesgo de malignización del 3-7%(314).

Neoplasias malignas (CEL)

La posible intervención vírica en la oncogénesis laríngea se describe con bastante frecuencia determinándose su verdadera implicación, primaria o como cofactor, en pocas ocasiones. Entre estos se encuentran el VHS y VPH. Es precisamente el objetivo de este trabajo determinar la presencia e implicación del VPH en las neoformaciones laríngeas.

El VPH16 ha sido relacionado en varias ocasiones con el carcinoma epidermoide de esófago en algunos estudios(102, 243), que podría explicarse por el paso del VPH desde la orofaringe al esófago, propagando su potencial oncogénico por su mucosa. La afectación de la laringe, por tanto, podría ser explicada por un implante viral directo o por un reflujo gastroesofágico, de manera indirecta.

Sólo en un metanálisis se analiza el RR de la infección por VPH y la génesis del carcinoma epidermoide, como en el de Li(28) que indica que a pesar de que la prevalencia ponderada en el CEL fue del 28%, inferior a los CECó (34,5%) o los orofaríngeos (45,8%)(26, 271), la asociación entre la infección por VPH y el riesgo de cáncer laríngeo es fuerte, con una OR de 5,39, mayor que la del CEOf (OR, 4,3) y CECó (OR, 2,0)(315).

Prevalencia global

En comparación con los estudios que relacionan el VPH con el CEOf, muchos menos estudios han abordado la asociación del VPH y el CEL, aunque no es desdeñable el número de ellos(12-25, 316, 317) e, incluso, disponiendo de metanálisis específicos del CEL al respecto(26-30).

La prevalencia del VPH en el CEL es muy variable. En los últimos metanálisis publicados, la prevalencia era muy coherente entre sí, estimada en 22,1-28%(26-30, 297). Si escogemos las series publicadas con más de 75 casos de CEL, la franja de prevalencia es muy amplia 4,9-58,8%(12-25) (Tabla 5).

Sin embargo, queda por determinar la verdadera causalidad del VPH en la génesis del CEL. En este aspecto, Gama(30) diferencia la prevalencia VPH en relación a pruebas PCR (sin transcripción viral), con una prevalencia de 26,8%; frente a las pruebas no-PCR (con transcripción viral: inmunohistoquímica,

Southern blot, HIS fluroscópica/no isotópica/cromogénica, captura de híbridos II o mixtas), con una prevalencia ponderada de 20,3%.

Muchos autores abogan por el estudio de la transcripción viral, mediante ARNm que codifica las proteínas virales E6/E7(20, 33, 281) o p16(25, 40, 43-47, 276, 281, 318, 319), entre otros. Duray demostró que la carga viral de VPH16 en cánceres laríngeos (mediana de 504 copias) era significativamente mayor que en lesiones benignas (mediana de 37 copias)(32), lo que apoya la idea de una infección activa del VPH y sugirió la carcinogénesis mediada por virus. Tras aplicar el estudio de transcripción, la prevalencia del VPH, el límite bajo se rebajaba notablemente en algunas series, ampliando el rango de variabilidad a 1,5-28%(30, 40, 44-47, 281, 320).

Serie simple	n	VPH
Syrjänen(12), 1987	116	12,9%
Cattani(13), 1998	75	29,3%
Ma(14), 1998	102	58,8%
Gorgoulis(15), 1999	91	20,9%
Vlachtsis(16), 2005	100	40%
de Oliveira(17), 2006	110	37,3%
Gungor(18), 2007	99	7,4 %
Morshed(19), 2008	93	35,5%
Hai-Rong(20), 2010	99	36,4%
Liu(21), 2010	84	41,66%
Lee(22), 2011	95	7,4%
Halec(23), 2013	92	35%
Hernández(24), 2014	148	21%
Xu(25), 2014	674	4,9%

Metanálisis	Estudios incluidos	Prevalencia ajustada
Kreimer(26), 2005	35	24,9%*
Isayeva(27), 2012	41	23,6%
Li(28), 2013	55	28%
Ndiaye(29), 2014	54	22,1%*
Gama(30), 2016	179	26,8% (PCR) / 20,3% (no-PCR)

* Incluyendo hipofaringe

Tabla 5. Prevalencia del VPH en series de CEL con n>75 muestras o en metanálisis

Prevalencia anatómica

Cuando se hacía un estudio pormenorizado por sublocalizaciones de la laringe, autores como de Oliveira(17), encontraron de manera significativa una mayor presencia en la glotis (45%) que en la supraglotis (27%). En el estudio de Morshed(19) la mayor prevalencia de VPH se encontró en la supraglotis, seguido de la glotis; sin embargo, estos grupos eran muy asimétricos por lo que probablemente la mayor presencia en la supraglotis pueda deberse a un sesgo de selección. En otros estudios(20, 23), realizados con PCR y ARNm E6/E7, pudo presentarse el mismo problema, dado que estudiaron muchos más tumores glóticos que supra o subglóticos, por lo que la mayor prevalencia del VPH fue glótica. El análisis estratificado por ubicación que realizó Li, en su metanálisis de 2013, mostró que la prevalencia de VPH entre los cánceres de la glotis fue mayor en comparación con la prevalencia en otros lugares, justificado probablemente por el microambiente de la glotis que podría favorecer la infección por VPH, ya que la unión escamocolumnar en el ventrículo es similar a la zona de transformación cervical(28). De igual modo, en el último metanálisis publicado(29), se postula que la

presencia del VPH en las diferentes sublocalizaciones es significativamente mayor en la glotis (34%) frente a la supraglotis (30%).

En general, dado que los tamaños muestrales son generalmente pequeños no puede llegarse a una conclusión sobre una predominancia de la prevalencia de VPH en una sublocalización de la laringe. En la serie publicada con mayor número de pacientes, la de Xu(25) con 674 CEL, reveló que el CEL VPH + es más frecuente entre los no fumadores ($p<0,05$), no bebedores ($p<0,05$) y en tumores supraglotis ($p<0,05$).

	No. studies	No. cases	Overall HPV prevalence (95% CI)	HPV16 prevalence (95% CI)
Larynx [†]				
Europe	19	799	21.3 (18.5-24.3)	13.8 (11.5-16.4)
North America	7	297	13.8 (10.1-18.3)	10.1 (7.0-14.1)
Asia	8	306	38.2 (32.8-43.9)	26.5 (21.6-31.8)
Other*	1	33	48.5 (30.8-66.5)	45.5 (28.1-63.6)

*Includes Central and South America, Australia, and Africa.

[†]Larynx includes cases of the hypopharynx.

Figura 24. Prevalencia del CEL en CECyC por sublocalización anatómica y geográfica²¹

La variabilidad en los datos de prevalencia, parecen estar relacionadas con:

- Diferencias geográfica y étnicas(26, 30, 277)
- Distinción inadecuada de pacientes con CEL de aquellos con otros cánceres de la región de la cabeza y el cuello, como el CEO(11) o más comúnmente el CE de hipofaringe(26, 29).
- Diferencias en sensibilidad y especificidad de los métodos de genotipificación del VPH(21, 25, 251) y, dentro de ellos, los diferentes criterios diagnósticos de positividad(25, 30). De hecho, algunos autores postulaban que dentro de los métodos de detección de ADN, los resultados mediante HIS eran más reales que mediante PCR(242).

Prevalencia geográfica

En el metanálisis de Gama se confirma que las diferencias de prevalencia encontrados en los diferentes estudios no son debidas al tipo de estudio del VPH (por métodos PCR o no PCR) sino a diferencias geográficas(30). Sin embargo, metanálisis como el de Isayeva(27), no encuentran diferencias geográficas en la prevalencia del VPH a lo largo del mundo; y Kreimer(26) a pesar de encontrar una mayor prevalencia en Asia (38,2%) frente a Europa (21,3%), no considera la diferencia como significativa, además de incluir casos de hipofaringe en el estudio del CEL (Fig. 25)

²¹ Extraído con permiso editorial de Kreimer et al. *Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2005 Feb;14(2):467-75)

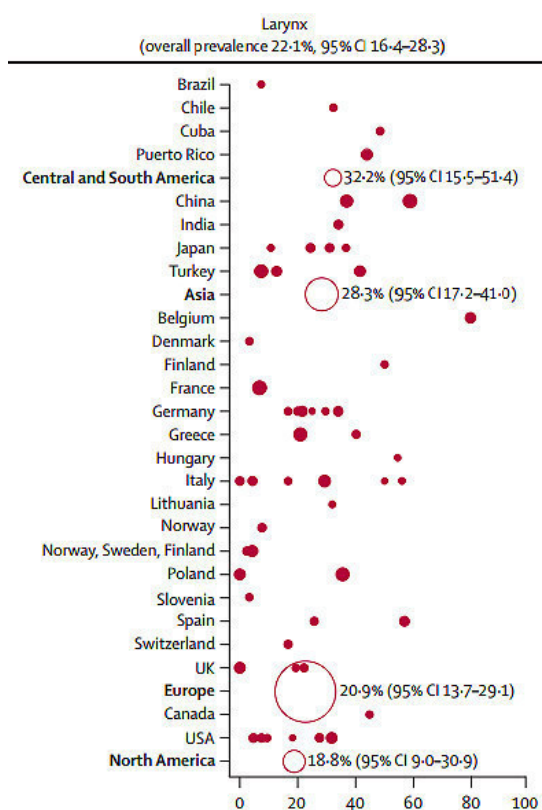


Figura 25. Prevalencia del CEL por distribución geográfica²²

Por el contrario, Ndiaye 9 años después, en 2014, establece que la mayor prevalencia del VPH relacionada con el CEL se da en Centroamérica y Sudamérica (32,2%) frente a Norteamérica como la de menor prevalencia (18,8%), cercana a Europa (20,9%); pero confirma los metanálisis previos, dado que su metaregresión constata que estas diferencias no son significativas⁽²⁹⁾ en el CEL; al contrario que en CEC o CEO donde sí resultaban significativas (Figura 25).

Según los datos actualizados del IARC - Global Cancer Observatory⁽³²¹⁾, dentro de España y teniendo en cuenta las estadísticas recogidas, el País Vasco tiene la incidencia de CEL más elevada (13,1 casos/100.000 personas/año) junto con Asturias (12,7 casos/100.000 personas/año). Comparándolo con otras regiones en el mundo sólo es igualado o superado por Villa Clara (Cuba) y Azores (Portugal) (Figura 26).

	Cases	Male				Cases	Female			
		ASR (W)	CUM 0-74				ASR (W)	CUM 0-74		
Spain, Albacete	130	8.9	0.84	1.10	0.11	6	0.4	0.19	0.05	0.02
Spain, Asturias	584	12.7	0.55	1.61	0.07	32	0.6	0.12	0.06	0.01
Spain, Basque Country	1139	13.1	0.40	1.61	0.05	74	0.8	0.10	0.09	0.01
Spain, Canary Islands	416	9.6	0.48	1.24	0.07	24	0.5	0.10	0.05	0.01
Spain, Ciudad Real	166	11.2	0.94	1.46	0.13	8	0.5	0.19	0.06	0.02
Spain, Cuenca	97	10.0	1.15	1.20	0.15	2	0.1	0.07	0.01	0.01
Spain, Girona	229	9.4	0.65	1.18	0.09	6	0.2	0.09	0.03	0.01
*Spain, Granada	299	9.8	0.60	1.29	0.08	13	0.4	0.12	0.05	0.01
Spain, La Rioja	128	10.4	0.98	1.20	0.13	8	0.5	0.20	0.05	0.02
Spain, Mallorca	258	9.6	0.61	1.22	0.09	17	0.5	0.15	0.05	0.02
Spain, Murcia	498	11.2	0.53	1.36	0.07	30	0.6	0.12	0.07	0.02
Spain, Navarra	263	11.0	0.71	1.32	0.09	14	0.6	0.17	0.07	0.02
Spain, Tarragona	264	9.9	0.64	1.20	0.08	15	0.6	0.15	0.07	0.02

Figura 26. Incidencia (n/100000) e incidencia acumulada (X), del CEL, en función del género, en España²³

Teniendo en cuenta estos datos, el estudio de Rodrigo⁽³¹⁷⁾ hace un análisis específico de la presencia del VPH en CE de laringe e hipofaringe, en la zona Norte de España (aunque solamente recoge pacientes del Hospital Central de Asturias, de 2002-2007) estableciendo que a pesar de la incidencia, el

²² Extraído de con permiso de Elsevier Ltd/The Lancet Oncology de Ndiaye C. et al. VPH ADN, E6/E7 mRNA, and p16INK4a detection in head and neck cancers: a systematic review and meta-analysis. Lancet Oncol. 2014 Nov;15(12):1319-31

²³ Extraído de IARC - Global Cancer Observatory. Cancer Incidence in Five Continents. 2017 (<http://gco.iarc.fr/>)

VPH no desempeñaba en su serie un papel significativo en el desarrollo de los CE laríngeos e hipofaríngeos en el norte de España.

Serotipos

El CEL, mucho menos estudiado que los CEC o CEO, presenta una mayor diversidad de serotipos de VPH otros tipos de VPH incluyendo(17, 19, 27, 29, 32, 36, 43, 276, 281, 322):

- **VPH bajo riesgo:** VPH6 y VPH11. Detectado de manera inusual, es considerado, en la mayoría de los casos, como una incidencia o un VPH *espectador* sin capacidad transcripcional(27).
- **VPH alto riesgo (establecido y probable):** VPH16, VPH18, VPH26, VPH31, VPH33, VPH35, VPH45, VPH51, VPH52, VPH56, VPH58, VPH59, VPH66, VPH68, VPH73 y VPH82.
- **VPH de riesgo indeterminado:** VPH19, VPH21, VPH22, VPH36, VPH38, VPH39, VPH41, VPH67, VPH69, VPH75 y VPH76.

El tipo de VPH más común detectado en los cánceres laríngeos es VPH16(12, 14-16, 19-27, 30, 38, 40, 281, 297, 315-317) y el VPH18 es el segundo tipo de VPH más común(15, 17, 19, 25, 27, 29, 297), seguidos del VPH6, VPH 33 y 11; y VPH 38 (Tablas 6 y 7). En muchos estudios se certificó la coexistencia de varios serotipos en una misma muestra(14, 15, 18, 22-24, 29, 297). Nunca, previamente se han descrito la presencia de VPH43 y/o HPV62.

Si se hace la distinción entre VPH-AR y VPH-BR, los más frecuentemente detectados son los de alto riesgo. Esto probablemente pueda verse sesgado dado que alguno autores solamente utilizan sistemas de detección de VPH-AR, sin estudiar los otros posibles VPH(13, 15, 17, 19, 20).

Serie	n	% de VPH	Método de detección	Tipos de VPH (por orden de presencia)
Syrjänen(12), 1987	116	12.9% (n=15)	HIS	11, 16, 6
Cattani(13), 1998	75	29,3% (n=22)	PCR	16, 18
Ma(14), 1998	102	58.8% (n=60)	PCR	16, 18, 6, 11, 33
Gorgoulis(15), 1999	91	20,9% (19)	HIS	16, 18, 16/33
Vlachtsis(16), 2005	100	40% (n=36)	PCR	16, 18
de Oliveira(17), 2006	110	37,3% (n= 41)	PCR	18, 16
Gungor(18), 2007	99	7,4 % (n=7)	PCR	11, 6, 16
Morshed(19), 2008	93	35,5% (n=33)	PCR	16, 18, 33
Hai-Rong(20), 2010	99	36,4% (n=36)	ARNm E6/E7	16
Liu(21), 2010	84	41,66 (n=35)	PCR	16, 18
Lee(22), 2011	95	7,4% (n=7)	PCR	16, 33 y otros
Halec(23), 2013	92	35% (n=32)	PCR + ARNm + p16	16, 56 y 11/16/33/42/45/53/56/70
Hernández(24), 2014	148	21% (n=31)	PCR	16/33, 18/51, 35/66, 31/39
Xu(25), 2014	674	4,9% (n=33)	PCR + p16	16, 18, 31, 33, 45

Tabla 6. Series de CEL con más de 75 muestras, con estudio de serotipos VPH y métodos de detección.

La separación entre "/" de los serotipos indica una misma prevalencia para dichos serotipos

Metanálisis	Estudios incluidos	Prevalencia ajustada	Serotipo más frecuente
Kreimer(26), 2005	35	24,9%*	16
Isayeva(27), 2012	41	23,6%	16
Li(28), 2013	55	28%	16
Ndiaye(29), 2014	54	22,1%*	16
Gama(30), 2016	179	26,8% (PCR) / 20,3% (no-PCR)	No especificado

Tabla 7. Metanálisis de CEL con estudio de prevalencia y serotipos VPH más frecuentes. Los estudios con “*” incluyeron la hipofaringe

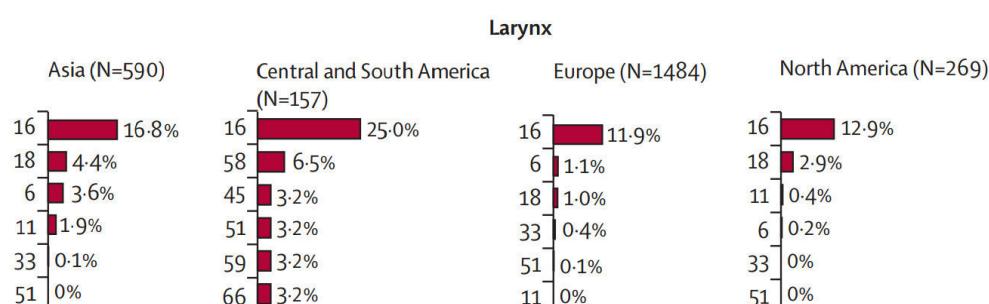


Figura 27. Distribución de los serotipos de VPH respecto al origen geográfico de los estudios²⁴

Tal y como se extrae de la última revisión de Ndiaye (Figura 27), la presencia del VPH16 como primer serotipo encontrado es constante y significativa; sin embargo cuando se estudia su distribución geográfica, presenta variaciones no significativas. Así como en la mayoría de estudios en otras sublocalizaciones, como la cavidad oral o la orofaringe el VPH18 es el segundo serotipo más frecuente; en el CEL es más variable, siendo el segundo el VPH18 (en Asia y Norteamérica), el VPH58 (Centro y Sudamérica) y el VPH6 (en Europa)(29).

Relación con factores tumorales o epidemiológicos

Estudios previos revelan que la presencia del VPH en el CEL, no se relaciona con características tumorales al diagnóstico como el tamaño (T), la afectación ganglionar (N), las metástasis (M); así como la edad al diagnóstico(16, 29, 32, 57). Al contrario de lo que se postulaba en los CECyC, concretamente en el CEOF(41, 55, 270, 278)

Por último, no se encontró una predominancia del VPH por género, siendo ésta similar en hombres y mujeres(28, 29, 32).

La serie publicada con mayor número de pacientes, la de Xu(25), reveló que el CEL VPH + es más frecuente entre los no fumadores ($p<0,05$), no bebedores ($p<0,05$) y en tumores supraglotis ($p<0,05$). Ningún metanálisis publicado hace referencia a cofactores como el tabaquismo, el alcoholismo, el sexo o datos sexuales.

²⁴ Extraído con permiso de Elsevier Ltd/The Lancet Oncology de Ndiaye C. et al. *VPH ADN, E6/E7 mRNA, and p16INK4a detection in head and neck cancers: a systematic review and meta-analysis*. Lancet Oncol. 2014 Nov;15(12):1319-31

Supervivencia asociada

Se dispone de muy pocos estudios de supervivencia asociada al VPH en el CEL, en los que el seguimiento suele ser máximo de 3 años(40) o 5 años(16, 19, 24, 32); con muy pocos con un estudio de supervivencia a largo plazo (más de 7-10 años)(25, 57).

Los estudios de la laringe no encontraron ninguna diferencia en la supervivencia en relación con la presencia del VPH(16, 19, 24, 32, 56, 323) o, si la encontraron fue ligera y no significativa(25, 57).

Por otro lado, recientemente D'Souza, una vez comparados los distintos subsitios de la cabeza y cuello, encontró que los pacientes con CEL presentaban significativamente menor riesgo de muerte en comparación con aquellos con CECo (aHR=0,72)(53) y, de manera no significativa, el riesgo de muerte se redujo en neoplasias VPH16+ y p16+ (aHR = 0,59) (Figura 28).

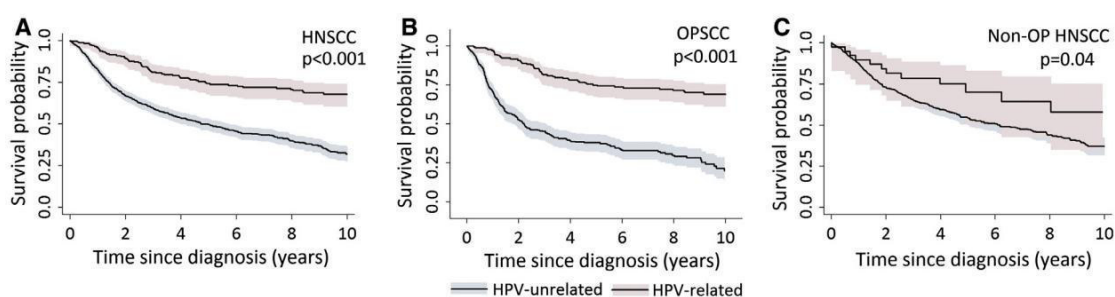


Figura 28. Supervivencia global a 10 años en función de la positividad al VPH en CECyC (HNSCC), CEOf (OPSCC) o no orofaríngeos (Non-OP HNSCC)²⁵

En el estudio de Chernock(40) se establece por primera vez una significativa correlación entre el p21 y p16 en los tumores VPH +, asociándose además con una mejor supervivencia global. No hubo diferencias significativas en la supervivencia libre de enfermedad.

En el estudio de Stephen comparó los resultados entre cohortes VPH + y VPH -, en función del tratamiento (RT sola, QT-RT o QT sola vs. Cirugía) sin encontrar diferencias significativas en términos de supervivencia. Además, encontró que el tipo de seguro médico que tenía el paciente era un factor predictor significativo en la supervivencia(57).

Siguiendo los postulados previos en la orofaringe, que evidenciaban al VPH como biomarcador de quimioradiosensibilidad(34) o mejores respuestas a la QT(41, 55); Shaughnessy(323) observó diferencias estadísticamente significativas en la supervivencia libre enfermedad a favor de los pacientes con VPH +/p16 +, en pacientes con CEL localmente avanzados tratados con QT-RT vs. cirugía. Además describió una mayor tendencia a la recidiva local en pacientes tratados con cirugía solamente. Por todo ello, postula un posible papel en la predicción de la respuesta al tratamiento.

²⁵ Extraído con permiso editorial de D'Souza et al. *Effect of VPH on head and neck cancer patient survival, by region and tumor site: A comparison of 1362 cases across three continents*. Oral Oncol. 2016 Nov;62:20-27

Por otro lado, se encontró que el riesgo de recidiva en los CECyC de origen no orofaríngeo (entre los que se encontraba el CEL) fue menos clara, sin poder extraer datos significativos(279); o fue menor, de manera no significativa(32).

Tratamiento

Actualmente, encontrar el tratamiento adecuado para los CECyC es un reto. Se llevan a cabo, siempre que el caso lo permita, protocolos de conservación de órgano, con un componente quirúrgico cada vez más selectivo. Según los últimos estudios revisados, parece que el CECyC VPH + parece tener un mejor pronóstico respecto al VPH -(34, 40, 41, 55, 323). Por ello, se siguen buscando posibles marcadores que pronostiquen la respuesta al tratamiento quimio y radioterápico como la expresión del p53, pRb, Bcl-xL, EGFR... con el objetivo de adecuar la terapéutica a cada neoplasia y disminuir la carga quirúrgica que conlleva alteraciones sociales y de la funcionalidad deglutoria, salivatoria, fonatoria y social del paciente.

Como se ha explicado con anterioridad se van conociendo determinador marcadores que parecen relacionarse positiva o negativamente con la respuesta a tratamientos y, consecuentemente, afectan a las tasas de supervivencia (Tabla 8). Los CE VPH + presentan una sobreexpresión y versiones alteradas (*wild types*) de los genes supresores de tumores p53 y pRb, que según Psyrrí(37) les confiere una especial quimioradiosensibilidad, hecho previamente constatado(36, 54, 55, 265, 269). Aunque las bases biológicas de este hecho son todavía desconocidas, parece ser que estas versiones *wild types* sufren un estrés inducido por la quimioterapia que deriva en una respuesta apoptótica y por tanto, una mejor respuesta terapéutica(54). De igual modo, Kim relaciona la menor expresión de p53 en pacientes p16 +, con una mayor supervivencia global en CEOF sometidos a QTí y posteriormente QT-RT(253). Del mismo modo, Bauer demostró como el estado del p53 y la expresión del Bcl-xL influyen en la respuesta *in vitro* de los CECyC al cisplatino(35). Ma estudió la relación entre la presencia del p53 y la presencia del VPH, concretamente en el CEL evidenciando que la sobreexpresión del p53 no era significativamente relacionable con la presencia del VPH(14).

	Niveles – Relación	Consecuencia
p53 pRb	Alteración (<i>wild types</i>) o Inhibición (en neoplasias VPH)	↑ Sensibilidad al tratamiento
	Menor inhibición (en neoplasias relacionada con tabaco-alcohol)	↓ Sensibilidad al tratamiento
p16	Elevados (en infecciones VPH)	↑ Sensibilidad al tratamiento
	Bajos (en neoplasias relacionadas con tabaco, por menor inhibición del p53)	↓ Sensibilidad al tratamiento
Bcl-xL	Elevados	↓ Supervivencia
	Bajos	↑ Supervivencia
EGFR	Elevados (en neoplasias relacionadas con tabaco)	↓ Supervivencia
	Bajos (en neoplasias NO relacionadas con tabaco)	↑ Supervivencia

Tabla 8. Marcadores influyentes en la respuesta al tratamiento y en la supervivencia asociada

Los estudios inmunohistoquímicos han mostrado la presencia de altas concentraciones de receptores del factor del crecimiento epidérmico (EGFR) en las células afectadas de carcinomas laríngeos(36). Ampliando el estudio de Bauer, se intentó relacionar ambos factores etiológicos (tabaco vs. VPH) en relación al marcador EGFR, aunque con una cohorte solamente de 42 biopsias de carcinomas orofaríngeos. El hábito tabáquico se relaciona con índices de expresión elevados de EGFR que es considerado un predictor negativo de respuesta terapéutica y de supervivencia. Por tanto, pacientes con niveles bajos de EGFR, independientemente de la presencia de VPH, presentan una supervivencia mayor a los 60 meses. Por el contrario, en pacientes con niveles elevados de EGFR especialmente en ausencia de VPH, se observan menores tasas de supervivencia(41).

A tenor de estos resultados las estrategias de protocolos de conservación de órgano deberían de aplicarse a estos tumores, siempre que sean VPH + dado el aumento supuesto de su sensibilidad a la QT y QT-RT(37, 54, 265, 269). En un estudio retrospectivo de Dinamarca, con la RT como única terapia y donde el p16 se utilizó como sustituto del VPH(324), la supervivencia a los cinco años y el control locoregional, fue notablemente mayor en el 62% entre los pacientes con p16 +, en comparación con el 26% en los pacientes p16 -. Por lo tanto, se extrapola el hecho de que los CECyC VPH +, son más sensibles a la RT y presentan más probabilidades de curación. *Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) 2399* fue un estudio de fase II de pacientes operables tratados con un tratamiento de terapia secuencial agresiva de QT_i seguido de quimioradioterapia (QT-RT) para la preservación de órganos. Evaluó prospectivamente el estado del VPH y el resultado terapéutico, encontrando una diferencia significativa en la supervivencia de los pacientes VPH + y un mayor control locoregional(325). Estos datos fueron corroborados en un estudio de la Universidad de Michigan que utilizó un único ciclo de QT_i para seleccionar pacientes susceptibles de tratamiento mediante RT o cirugía. Encontraron que las respuestas a la QT_i se correlacionaban con el estado del VPH, al igual que la supervivencia específica de la enfermedad(326). El *Radiation Therapy Oncology Group (RTOG)* dispone de datos muy extensos y resultados analizados retrospectivamente en CEO_f(327) obteniendo datos de supervivencia global y libre de enfermedad a y 5 años, superiores en pacientes VPH +; comparando datos de quimioradiación con fraccionamiento acelerado vs. fraccionamiento regular, ambos con cisplatino. Por otro lado, la relación del VPH con el p16 parece suponer un factor de buen pronóstico, obteniendo mejores resultados en pacientes con CECyC tratados solamente con RT; mejorando significativamente el control locoregional, la supervivencia libre de enfermedad y la supervivencia global(307). El estado del tumor VPH16, la supervivencia y la demografía fueron tenidos en cuenta en los pacientes CEO_f tratados en el estudio de los taxanos TAX324, ensayo clínico internacional aleatorizado de fase III. TAX324 comparaba la supervivencia entre terapia secuencial con TPF (docetaxel, cisplatino y 5-fluorouracilo) vs. PF (cisplatino y 5-fluorouracilo), seguido de QT-RT con carboplatino semanal, en pacientes con CECyC localmente avanzado. Los datos mostraban una diferencia significativa en los resultados de supervivencia y fracaso entre los pacientes con VPH + y -. Los CECyC VPH + fueron significativamente más jóvenes, presentaron una mayor supervivencia global y libre de enfermedad(295).

Por otro lado, algún estudios retrospectivos se indica que los pacientes con CEO_f VPH + tienen un pronóstico significativamente mejor que los pacientes con CEO_f debido a tabaco u otros factores ambientales, independientemente de la intervención terapéutica(328).

Vacunación

El desarrollo de vacunas preventivas contra la infección por VPH se debió al descubrimiento del VPH como una causa necesaria de algunos cánceres anogenitales, como el cáncer cervical. Desde entonces se ha descubierto que la inmunización con partículas parecidas al virus que imitan a la proteína L1 producen una respuesta de anticuerpos humorales que es significativamente mayor que la producida por la infección natural por VPH(231).

En la actualidad, hay dos vacunas de VPH disponibles comercialmente:

- **Vacuna cuatrivalente:** Diseñada para proteger contra los subtipos de alto riesgo **VPH16** y **VPH18**, y subtipos de bajo riesgo **VPH6** y **VPH11** (Gardasil®, Merck y Co., Whitehouse Station, NJ)
- **Vacuna bivalente:** Diseñada para proteger contra subtipos de alto riesgo **VPH16** y **VPH18** (Cervarix®, GlaxoSmithKline Biologicals, Rixensart, Bélgica).

Varios ensayos controlados aleatorios de doble ciego, que involucran a miles de mujeres jóvenes, han demostrado una eficacia muy notable para la prevención de enfermedades relacionadas con el VPH. Estos ensayos incluyen los ensayos FUTURE I/FUTURE II (Gardasil®), el ensayo PATRICIA (Cervarix®) y el ensayo de vacunas contra el VPH en Costa Rica (Cervarix®). Tanto Gardasil como Cervarix tuvieron un 90,9-100% de eficacia para prevenir lesiones benignas y premalignas relacionadas con el VPH en mujeres jóvenes que recibieron las tres dosis de vacuna(329, 330). Del mismo modo, un ensayo controlado aleatorizado doble ciego con más de 4.000 hombres jóvenes en 18 países mostró que Gardasil tenía > 90% de eficacia para la prevención de lesiones benignas y premalignas relacionadas con VPH anogenital cuando se administraron las tres dosis. Estos ensayos también han demostrado perfiles de seguridad excelentes(330), lo que lleva a iniciativas de salud pública a nivel mundial para vacunar a las niñas y niños preadolescentes.

En análisis preliminares parece haberse evidenciado que ambas vacunas poseen una ligera protección cruzada frente a los serotipos VPH31 y VPH45, estrechamente relacionados con los serotipos VPH16 y VPH18(331).

La posología no ha sido establecida aún en el rango poblacional <9 años a >26 años. Por el contrario, en pacientes de 9-26 años se administra 3 dosis de 0,5 ml. vía intramuscular, administrando la segunda dosis al primer (cuadrivalente) o segundo (bivalente); y la tercer dosis al sexto mes de la primera dosis, respectivamente. Debe tenerse en cuenta la posible interacción con terapias inmunosupresoras como la RT, QT o corticoterapia; que pueden disminuir la respuesta inmune a la vacuna. Como única contraindicación se encuentra el haber padecido una hipersensibilidad documentada a la vacuna o alguno de sus componentes y/o excipientes. Deben tenerse precauciones en el embarazo donde tiene una evidencia suficiente de riesgo fetal en animales, no así en humanos.

A principios de 2007, los programas de vacunación universal contra el VPH se implementaron en la mayoría de los países occidentales. Sin embargo, el alto costo de la vacuna, la difusión de los movimientos en contra de la misma y las dificultades para llegar a la población adolescente, que es el objetivo de la vacunación, han impedido una amplia cobertura(332). Además, la mayoría de los programas de vacunación existentes se dirigen únicamente a las niñas preadolescentes, a través de centros escolares o de centros de salud, con algunos programas de rescate para niñas y mujeres mayores. Por lo tanto, la mayoría de los países actualmente no incluyen a los niños en los programas de vacunación contra el VPH.

Existe una controversia en incluir a los hombres dentro de la vacunación universal, ya que es probable que incluirlos reduzca aún más la incidencia de enfermedades relacionadas con el VPH en ambos sexos. En cambio otros estudios, que analizan la rentabilidad de esa medida, indican que la inclusión de varones en los actuales programas de vacunación contra el VPH puede no ser rentable si se alcanza una alta cobertura de las mujeres(333, 334). Este planteamiento probablemente sea erróneo, teniendo en cuenta que en Europa, se estima que aproximadamente el 30% de todos los cánceres relacionados con VPH ocurren en varones(209). Por otra parte, los hombres que tienen relaciones sexuales con hombres recibirían poco beneficio de las estrategias basadas en la vacunación de las mujeres solamente. De hecho, estos estudios no consideran la tendencia epidemiológica de las enfermedades relacionadas con el VPH, con un aumento constatado en la incidencia de cánceres anales y de cabeza y cuello(335).

Por lo tanto, debe enfatizarse que el impacto potencial en la población de la actual vacuna profiláctica contra el VPH en cánceres distintos del cáncer de cuello uterino es particularmente importante porque, lamentablemente, existen muy pocos programas de cribado eficaces para la mayoría de estos tumores malignos.

Terapias génicas

A pesar del éxito de las vacunas preventivas, las terapias dirigidas a la eliminación de la infección por VPH o las lesiones relacionadas con el VPH siguen siendo investigadas. Los agonistas de receptores tópicos de *toll-like* han demostrado cierta eficacia para el tratamiento de lesiones genitales relacionadas con el VPH, aunque su uso en CECyC relacionado con el VPH todavía no se ha estudiado(336).

La administración de inmunoterapia a través de vectores virales también se está investigando en pacientes con CECyC; como por ejemplo, un virus vacunal que expresa E6, E7 y IL-2 humana (TG4001) ha demostrado eficacia en el tratamiento de lesiones premalignas del cuello uterino(337) o, en un ensayo clínico fase II(338) se está evaluando la eficacia de este virus vacunal en combinación con QT-RT, en pacientes con CEOF VPH +(337). De igual modo, se está utilizando a la bacteria *Listeria monocytogenes* como un vector viral, en ensayos de CEOF VPH +(337, 339).

Ha habido un interés reciente en los puntos de control inmunes como las vías críticas por las que el VPH evade la respuesta inmune del huésped. Estos puntos de control incluyen las vías programadas de la proteína de muerte celular 1 (PD-1) y las vías citotóxicas del antígeno 4 de linfocitos T. PD-1 se expresa en muchos tipos de células y suprime las respuestas de las células T a la infección. Los CEOF VPH + parece que presentan una expresión de PD-1 más elevada que el tejido amigdalino benigno(340), por lo que pudiera suponer una posible estrategia terapéutica futura para estos tumores. Por otro lado, recientemente, estudios preclínicos han informado de que los animales inmunizados con vacunas que estimulan células T CD8+ específicas para VPH muestran una regresión de cánceres VPH dependientes(222).

Por otro lado Rampias examinó el efecto de la supresión de los oncogenes E6 y E7, en líneas celulares pertenecientes a CEOF. Posteriormente por PCR analizaron cuantitativamente la expresión de los genes p53 y pRb. Con la inhibición la expresión de los E6 y E7, y consecuentemente los niveles de su

ARNm, resultaron un 85% menor que en el grupo control. Ello conllevaba la restauración de la expresión de los genes p53 y pRb, con la consecuente sobreexpresión de los genes objetivo del p53 (p21 y FAS), disminución de la expresión de aquellos genes que están sobreexpuestos en caso de ausencia funcional del pRb (DEK y B-MYB) e inducción la apoptosis de las células VPH16 +, en CEOF(234).

El EGFR está altamente expresado en un gran porcentaje de CECyC(341), y se ha encontrado un anticuerpo monoclonal específico contra el receptor (cetuximab), con eficacia clínica. La proteína viral E5 tiene efectos directos sobre el tráfico de EGFR en la célula, además de mejorar la activación de la vía del EGFR. Existe un ensayo clínico en curso para el cáncer orofaríngeo asociado al VPH mediante QTi seguida de cetuximab con RT en dosis reducida o estándar, con el objetivo de determinar si los resultados comparables para el cáncer asociado con el VPH pueden lograrse con radiación menos intensiva dirigiéndose al EGFR(256). Sin embargo, la interacción entre estos factores de riesgo no se entiende completamente, ya que la positividad del VPH presagia un buen resultado en el cáncer orofaríngeo, mientras que la expresión del EGFR es un factor de riesgo independiente para un mal pronóstico en el CECyC(41, 342). En dicha búsqueda de respuestas, se han encontrados otros posibles receptores para EGFR (por ejemplo HER2 y HER3) y la ruta de la fosfoinositido-3-kinasa (PI3K). Las alteraciones en la vía PI3K son comunes en pacientes con CECyC, y confieren resistencia a los inhibidores de EGFR, provocando mutaciones más frecuentes en los tumores VPH +. Utilizando estas dianas terapéuticas se ha demostrado cierta actividad clínica con resultados prometedores con el inhibidor irreversible de tirosin-kinasa de EGFR y HER2 (afatinib)(343), el inhibidor doble de EGFR y HER2 (lapatinib)(344) o el inhibidor del panEGFR (dacomitinib)(345). Sin embargo, como se mencionó anteriormente, la interacción entre la inhibición de la vía EGFR y el estado del VPH no está clara en la actualidad.

El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) ha sido implicado en muchos tumores como promotor de la angiogénesis tumoral. Hay pruebas de que las proteínas E6 y E7 del VPH16 pueden aumentar la expresión de VEGF(346) y que E5 aumenta la expresión de VEGF a través de la vía EGFR. Este hallazgo tiene relevancia debido a que en el mercado existe un inhibidor comercialmente disponible del VEGF (bevacizumab), aunque no se han realizado estudios clínicos hasta la fecha para evaluar su uso en CECyC asociado al VPH.

Estas alteraciones genéticas y biomarcadores son potenciales receptores terapéuticos, por lo que está justificado investigar más a fondo su implicación clínica y las posibilidades futuras de desarrollar tratamiento mucho más específicos y efectivos.

PROTEÍNA DE TRASCRIPCIÓN P16

p16 y oncogénesis

El gen supresor tumoral p16 está localizado en el cromosoma 9p21 y es miembro del INK4, inhibidores del ciclo celular, representando un componente clave de la vía de la proteína del retinoblastoma (pRb). La unión del producto del gen supresor tumoral p16 con quinasas 4 y 6 dependientes de ciclina bloquea su interacción con ciclinas de tipo D (Ciclina D1 o CCND1), mantiene el gen Rb en un estado hipofosforilado, que se une al factor de transcripción E2F y, a su vez, evita la progresión del ciclo celular(236).

En el CECyC no relacionado con el VPH, el gen supresor tumoral p16 se inactiva por diversas modificaciones genéticas y no genéticas (por ejemplo, hipermetilación del gen promotor), de manera que la expresión de su producto proteico se pierde o disminuye de manera importante(347), es decir, la cuantificación del p16 está disminuida.

Por el contrario, en los CECyC VPH +, la integración del VPH-AR en el genoma del huésped se asocia con la regulación positiva del producto del gen supresor tumoral p16, es decir, aumenta la expresión de la proteína p16. Adicionalmente, la integración del genoma causa la delección del promotor del gen E2 viral, causando el aumento de la transcripción de E6 y E7(237). La unión de la oncoproteína E7 a la pRb conduce a la degradación de la pRb y, presumiblemente, a la sobreexpresión compensatoria de proteínas p16 citoplasmáticas y nucleares en las células tumorales infectadas por VPH.

En general, por tanto, se acepta que el uso de la tinción inmunohistoquímica p16 es aceptable como método de detección del VPH, siempre que se utilice e interprete en un contexto definido que tenga en cuenta ciertos factores anatómicos, hallazgos histológicos y características de tinción(242).

Medición del p16

La determinación de la expresión del p16 es un marcador razonable a tener en cuenta sobre la actividad transcripcional del VPH, distinguiendo a los tumores VPH +(34, 37, 42, 43, 246, 247). A su vez, elevados niveles de la proteína p16 parecen estar asociados con el potencial oncogénico del tumor VPH dependiente, ya sea en lesiones genitales(238) como en la cabeza y el cuello(37).

Por tanto, se postula que el uso de la tinción inmunohistoquímica p16 es aceptable como método de detección del VPH, siempre que se utilice e interprete en un contexto definido que tenga en cuenta ciertos factores anatómicos, hallazgos histológicos y características de tinción(242). La tinción inmunohistoquímica p16 puede sustituir la prueba de VPH cuando está presente fuerte tinción en el núcleo y el citoplasma de las células tumorales a través de la totalidad o la mayor parte del tumor.

La técnica de detección del p16 ha mostrado una alta sensibilidad con una especificidad moderada-alta. Sin embargo, alrededor del 10% de los CECyC VPH - resultan ser p16 +(29, 274), lo que podría deberse a una clasificación errónea de las muestras positivas/negativas. Por tanto, la tinción focal

o débil del p16 debe estar respaldada por pruebas de VPH (ya sea por métodos in situ o basados en PCR)(242). Otros autores estiman que el p16 puede resultar un método fiable para valorar para el estado del VPH en el tumor, sólo en CEOF; no así en los de otra localización como los de cavidad oral o laríngeos(279).

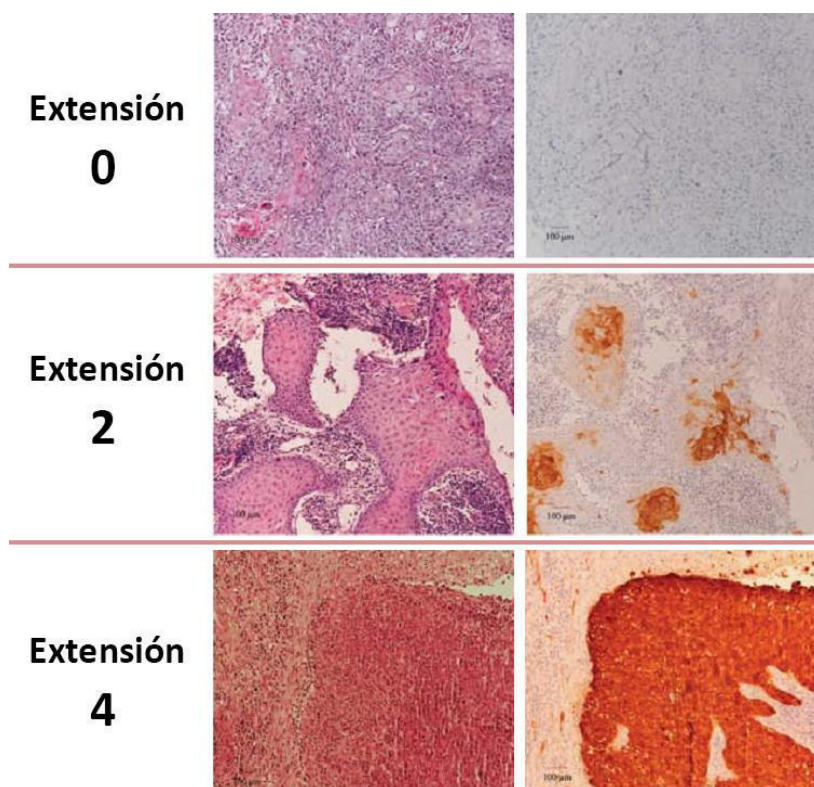


Figura 29. Puntuación del grado de extensión en función del resultado del estudio inmunohistoquímico al p16 (derecha) frente a tinción clásica de hematoxilina-eosina. Puntuado como 0 (no tinción), 2 (positivo en 11-40% de las células tumorales) o 4 (positivo en >70% de las células tumorales)²⁶

Como puede observarse, los resultados de la positividad al p16 difieren mucho entre la series, debido a las diferencias en los criterios utilizados para la establecer la positividad(46). En algunos estudios la expresión de p16 se puntuó positiva solamente cuando se observó tinción citoplasmática y nuclear fuerte y difusa en todas las células basales y suprabasales, en todos los nidos de tumor. Otros estudios definen la expresión de p16 en los tumores como fuerte y difusa cuando $\geq 70\%$ de las células (citoplasma y núcleos) están teñidas(25, 244, 348); mientras que Fischer evaluó los tumores como p16 + cuando $\geq 5\%$ de las células eran inmunopositivas(349).

En general se acepta que la expresión de p16 se puntúe basándose tanto en tinción citoplasmática como nuclear y utilizando un método de puntuación semicuantitativa de Koo(350). De este modo, se asigna una puntuación de intensidad de tinción (No tinción: 0, débil: 1, moderada: 2, fuerte: 3)

²⁶ Extraído con permiso editorial de Deng et al. *A comprehensive evaluation of human papillomavirus positive status and p16INK4a overexpression as a prognostic biomarker in head and neck squamous cell carcinoma*. Int J Oncol. 2014 Jul;45(1):67-76

y/o en función de la puntuación de extensión (0%: 0, 1-10%: 1, 11-50%: 2, 51-80%: 3, 81-100%: 4) (Figura 29).

Smeets(351) trató de encontrar un algoritmo efectivo mediante PCR del *primer* general del VPH (GP 5+/6+), HIS del VPH16, ARNm E6 del VPH16, inmunotinción del p16 y detección serológica de anticuerpos contra el VPH16. Encontraron que el algoritmo más fiable con un 100% de sensibilidad y especificidad fue la combinación de inmunotinción p16 (primero) y de PCR del GP5+/6+ (segundo), en los casos p16 +.

En el CECyC

Se ha descrito una fuerte correlación entre la infección por VPH y la expresión de la proteína p16, sobre todo en CEOf(29, 34, 53). Por ellos, el p16 se puede presumir a ser un biomarcador sustituto de la infección por VPH-AR en estos tumores(34, 269, 351).

En el metanálisis de Ndiaye(29) se reportó una prevalencia del p16 en el 28,1% de los CECyC y del 86,7% de los CEOf. El número de estudios disponibles para este análisis fue francamente limitado para la cavidad oral (con solo dos estudios de referencia), por lo que probablemente los resultados sean discutibles. El análisis de tendencias en el caso del CEOf reveló que, de manera significativa, no se evidenció un aumento de la positividad al p16 en el tiempo.

Según D'Souza, el 60% de los CEOf son positivos para p16, sobre una cohorte de 863 pacientes, con mayor predominancia en blancos. La población negra presentó, de manera significativa, el menor porcentaje de casos negativos, comparada con blancos, asiáticos o hispanos. Al contrario de lo postulado por Ndiaye(29), que sí observó un notable y significativo aumento de la positividad al p16 en el tiempo, de 1995 a 2012, en ambos sexos.

De nuevo, los resultados de D'Souza y Ndiaye son contrapuestos, dado que según D'Souza la prevalencia del p16 en los sitios no orofaríngeos (CECyC y CEL) fue considerablemente menor, siendo la mitad de ellos de origen laríngeo(53). Sin embargo, Ndiaye observó una prevalencia de p16 del 86,7% en los CECyC y del 86,3% para los CEL(29).

Supervivencia asociada

A tenor de todos estos resultados, con la excepción de la hipofaringe, el p16 puede funcionar como un muy buen sustituto para confirmar el carácter tumoral del VPH(34, 42, 43, 246, 247) y supone un indicador significativo de mejor pronóstico en términos de supervivencia global en CECyC(53, 246, 303, 307, 352) y libre de enfermedad(246, 307). Esto puede ayudar en el desarrollo modalidades de tratamiento específicas para pacientes con tumores que expresan p16.

De este modo, Ang postuló que la expresión de p16 tiene el potencial predictor positivo para el aumento de la supervivencia(34) y demostró que la expresión de p16 era un factor pronóstico

independiente más fuerte para la supervivencia global (así como la supervivencia libre de progresión) que la propia presencia de ADN del VPH.

En el reciente metanálisis de Sedghizadeh(246), se ha demostrado que hay evidencia para apoyar que los pacientes con CEOf que sobreexpresan p16 tienen un mejor pronóstico que aquellos que no lo expresan. Dentro de las limitaciones de su estudio destaca el escaso número de estudios, a pesar de lo cual obtienen un análisis de sensibilidad y especificidad suficiente para la extracción de conclusiones. En dicho metanálisis se estudiaron las razones de riesgo de la supervivencia global (HR) para pacientes p16+, encontrando que presentaban una supervivencia global significativamente mejor ya se estudiara solamente el p16 (HR=0,360, $p < 0,001$) o asociado a otros estudios de presencia del VPH, como el ADN VPH+ (HR = 0,310; $p < 0,001$) o el ARNm VPH+ (HR = 0,344; $p < 0,001$). Por tanto, de manera similar a estudios previos, se postula que la presencia del p16 es un indicador significativo de mejor pronóstico en términos de supervivencia global en CECyC, ahondando en que la cohortes con mejores supervivencias son las que tienen positividad tanto a VPH como a p16(246, 303, 307, 352).

En el metanálisis publicado por D'Souza(53), se concluye que el p16 supone un buen biomarcador de los tumores VPH dependientes en la orofaringe. En este estudio se evidenció que, de manera significativa, los resultados de supervivencia extraídos a partir del ADN del VPH, de la positividad al p16 o de ambos, son equiparables. Es decir, el p16 suponía un buen biomarcador de los tumores VPH dependientes en la orofaringe. Sin embargo, cuando se estudiaban los carcinomas de origen no orofaríngeo(53), este postulado no se aplicaba (Figura 30).

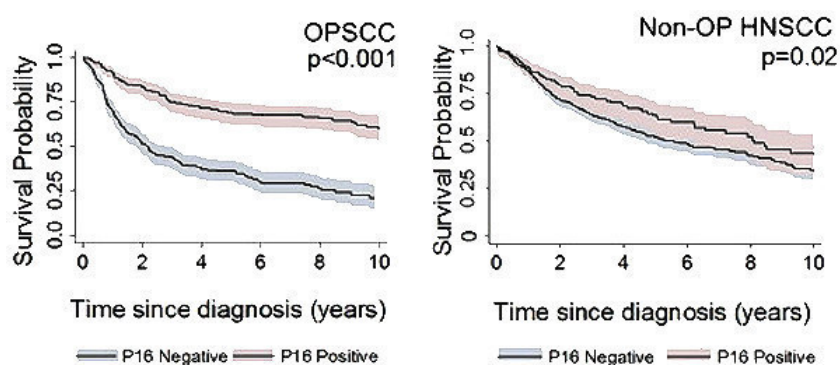


Figura 30. Curvas de Kaplan-Meier de supervivencia global en función de la positividad al p16, en CEOf (OPSCC) o en CE no orofaríngeos (Non-OP HNSCC)²⁷

Cuando se estudiaba la tasa de recurrencia, se extraía que la tasa de fracaso locorregional en los CEOf era significativamente menor en los p16+, ya se estudiaran únicamente con el p16 (HR=0,602; $p < 0,001$) o junto a la presencia del VPH (HR=0,313, $p < 0,001$)(246). Ello, consecuentemente influía en la supervivencia libre de enfermedad, que era significativamente menor en los pacientes p16+ (HR = 0,351, $p < 0,001$). Este mismo precepto es compartido por Lassen, que encontró al p16 como un factor protector para recidivas locoregionales en pacientes tratados solamente con RT; evidenciándose mejores tasas de supervivencia global y libre de enfermedad, que los p16 -(307).

²⁷ Extraído con permiso editorial de D'Souza et al. *Effect of HPV on head and neck cancer patient survival, by region and tumor site: A comparison of 1362 cases across three continents*. Oral Oncol. 2016 Nov;62:20-27 (Supplementary material)

Si se estudiaba la tasa de supervivencia específica de la enfermedad, es decir, el porcentaje de personas que no han muerto de cáncer desde el momento del diagnóstico los pacientes p16+ presentaban una significativa mayor supervivencia específica que los p16-; ya estudiara sólo con el p16 (HR=0,598, p=0,001) o con el VPH ADN + (HR=0,300; p<0,001) o con ARNm+ (HR = 0,390; p<0,001)(246).

Por el contrario, los tumores hipofaríngeos no parecen compartir los datos de positividad asociada a la presencia del p16. En ellos, la expresión al p16 no tuvo un valor predictivo ni supuso una mejora en la supervivencia global o libre de enfermedad; según lo publicado por Wilson en una cohorte de 27 pacientes tratados con RT(353).

En el CEL

La presencia de positividad al p16 en los CEL es muy variable, dependiendo de los criterios de positividad establecidos por cada autor. Duray encontró que el 97% de los CEL estudiados eran p16+(32). Según la serie de D'Souza de entre los subtipos no orofaríngeos, la laringe fue la sublocalización anatómica que más presencia del p16 demostró(53). En el metanálisis de Ndiaye(29) la positividad al p16 alcanzó el 86,3%.

Por otro lado, en contraste con la creciente prevalencia de la proporción de tumores p16 + en el CEOF a lo largo del tiempo, entre los tumores de origen distinto a la orofaringe (entre los que se encuentra el CEL) no se observó una tendencia creciente en el tiempo, entre 1995 y 2012(53).

A pesar del número de estudios centrados en el CEOF, no hay muchas series laríngeas con más de 45 muestras(40, 44-47), que quedan detalladas en la Tabla 9, junto a su mediana de seguimiento, supervivencia asociada al p16 y significación estadística. El rango de prevalencia del p16 en el CEL de las series revisadas es 6,5-28%(40, 44-47).

Nombre	n	p16 (%)	Mediana seguimiento (meses)	Mejor supervivencia	Significación estadística
Chernock(40), 2013	76	28%	34,6	p16 +	p=0,058 (SVG)
Chung(45), 2014	181	17.1%	No especificado (máx. 60 meses)	p16 +	p=0,08 (SvG) p=0,11 (SvLE)
Salazar(44), 2014	50	24%	67	† p16 –	p=0,8916 (SvG) p=0,8 (SvLE)
Larque(46), 2015	45	9%	48	p16 –	p=0,082 (SvG)
Young(47), 2015	307	6.5%	41	Similar	p=0,65 (SvG) p=0,22 (SvLE)

Tabla 9. Frecuencia de detección del p16 en CEL en series publicadas con más de 45 muestras. Descripción del seguimiento y supervivencia asociada en cada serie. SvG (Supervivencia Global), SvLE (Supervivencia Libre de Enfermedad) y las series con † estudian específicamente la supervivencia incluyendo al CEL dentro del grupo de "CECyC no orofaríngeos" sin especificar la supervivencia específica en la laringe

Supervivencia asociada

En general, tal y como se puede observar en la Tabla 9, la presencia del p16 en el CEL se ha asociado a mejores tasas de supervivencia(40, 45, 48), pero no se dispone de muchas series que asocien un seguimiento prolongado, casi nunca mayor a 5 años(44). Por otro lado, otros autores no diferencian la laringe de otras sublocalizaciones o la engloban dentro del término de localización “no orofaríngea”, por lo que provocan una pérdida de especificidad estadística(44, 53).

Según Duray(32), los pacientes con p16+ tuvieron una menor tasa de recurrencia local, sin ser este hecho estadísticamente significativo. En el estudio de Chernock(40) se establece por primera vez una significativa correlación entre el p21 y p16 en los tumores VPH +, asociándose además se asoció con una mejor supervivencia global. No hubo diferencias significativas en la supervivencia libre de enfermedad.

Para otros autores, al contrario de lo que ocurría en la orofaringe, el p16 no supone un biomarcador que influya en el pronóstico ni asocie una mayor supervivencia en el CEL(47, 53, 305) (Figura 31).

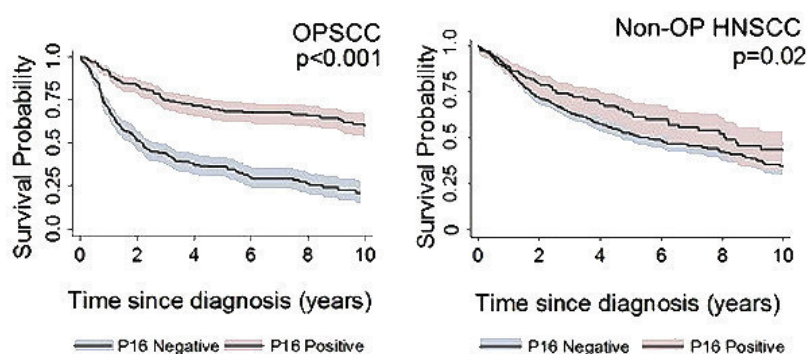


Figura 31. Curvas de Kaplan-Meier de supervivencia global en función de la positividad al p16, en CEOF (OPSCC) o en CE no orofaríngeos (Non-OP HNSCC)²⁸

Del mismo modo Liang(48) establece que la positividad al p16 de manera unitaria no se asocia a una mejor supervivencia. Sin embargo, cuando se asocia el p16 a la serología del E6/E7, los pacientes que presentan positividad a ambos (p16+ y E6/E7 +) presentan las mejores tasas de supervivencia(48).

Lamentablemente sólo algunos estudios hacen una referencia concreta a las tasas de supervivencia libre de enfermedad, en relación con la presencia del p16, con resultados completamente diferentes y, nunca estadísticamente significativos(44, 45, 47). Unos refieren una supervivencia libre de enfermedad similar entre ambas cohortes (positivas y negativas)(47), otros refieren mejor supervivencia en la cohorte p16 -(44), mientras que otros, al contrario, una mejor supervivencia libre de enfermedad en la población p16 +(45). Por otro lado, Uno de los posibles factores implicados en dicha variabilidad de los resultados puede ser el seguimiento realizado.

²⁸ Extraído de Extraído de D'Souza et al. *Effect of HPV on head and neck cancer patient survival, by region and tumor site: A comparison of 1362 cases across three continents*. Oral Oncol. 2016 Nov;62:20-27 (Supplementary material)

ESTUDIO ACERCA DE LA INFLUENCIA DEL VPH Y LA PROTEÍNA P16 EN EL CARCINOMA DE LARINGE

JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

La implicación del VPH y la proteína p16 en los CECyC, tal y como se ha detallado anteriormente, comienza a ser demostrada. Sin embargo, la obtención de datos respecto al CEL es complicado debido a que se disponen de pocas series centradas en esta localización de manera específica y no junto a otras sublocalizaciones como la hipofaringe. Por otro lado, en muchas ocasiones las series resultan heterogéneas en el tratamiento oncológico, por lo que extraer conclusiones respecto a la implicación de estos factores en la supervivencia es complejo.

Por todo ello, es necesario realizar un estudio específico del VPH y la p16, centrado en la laringe; concretamente en aquellos tumores de origen glótico. Debe buscarse una población homogénea en el tratamiento (cirugía como tratamiento primario), con diferentes grados de afectación tumoral, con un seguimiento prolongado (de al menos de 10 años); relacionando estos datos con factores epidemiológicos susceptibles de resultar significativamente pronósticos o influyentes en el desarrollo oncogénico y en la supervivencia.

Todo ello se enmarca y constata en un interés creciente en la implicación del VPH y la p16 en el CEL, como se detalla a continuación.

Relevancia

Para analizar la relevancia de nuestro estudio de investigación y el estado actual del estudio del VPH y la proteína p16 en relación con el CEL, se llevaron a cabo búsquedas en Pubmed, en la web www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed (relevancia internacional); en el Acta Otorrinolaringológica Española (relevancia nacional publicada) y en los programas de los congresos de la Sociedad Española de Otorrinolaringología y Cirugía de Cabeza y Cuello, SEORL-CCC (relevancia nacional presentada a la sociedad científica). El tiempo estudiado fue dependiente de la digitalización de cada uno de las fuentes estudiadas hasta Diciembre 2016.

Internacional (Pubmed)

Relación del VPH con el Cáncer de Cabeza y Cuello

A partir de la cadena de búsqueda "hvp[All Fields] AND ("head and neck neoplasms"[MeSH Terms] OR ("head"[All Fields] AND "neck"[All Fields] AND "neoplasms"[All Fields]) OR "head and neck neoplasms"[All Fields] OR ("head"[All Fields] AND "neck"[All Fields] AND "cancer"[All Fields]) OR "head and neck cancer"[All Fields]) NOT (("larynx"[MeSH Terms] OR "larynx"[All Fields] OR "laryngeal"[All Fields]) AND ("papilloma"[MeSH Terms] OR "papilloma"[All Fields] OR "papillomas"[All Fields])) NOT ("papilloma"[MeSH Terms] OR "papilloma"[All Fields] OR "papillomatosis"[All Fields]) AND

"humans"[MeSH Terms]" se encontraron **2863 artículos**, desde Mayo 1984 hasta Diciembre 2016. Al analizarlo por años se observó una tendencia claramente creciente de las publicaciones que relacionan el VPH con las neoplasias de cabeza y cuello.

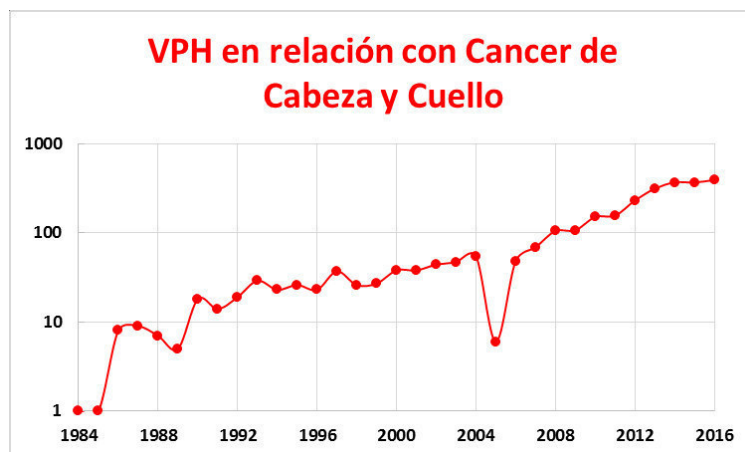


Figura 32. Distribución de artículos publicados acerca del VPH y el CECyC desde 1984 a 2016 en Pubmed (www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed)

Relación del VPH con el Cáncer de Laringe, en grupos heterogéneos

A partir de la cadena de búsqueda "(hvp[All Fields] AND ("laryngeal neoplasms"[MeSH Terms] OR ("laryngeal"[All Fields] AND "neoplasms"[All Fields]) OR "laryngeal neoplasms"[All Fields] OR ("larynx"[All Fields] AND "cancer"[All Fields]) OR "larynx cancer"[All Fields])) NOT (("larynx"[MeSH Terms] OR "larynx"[All Fields] OR "laryngeal"[All Fields]) AND ("papilloma"[MeSH Terms] OR "papilloma"[All Fields] OR "papillomas"[All Fields])) NOT ("papilloma"[MeSH Terms] OR "papilloma"[All Fields] OR "papillomatosis"[All Fields]) AND "humans"[MeSH Terms]" se encontraron **294 artículos** donde se incluían series provenientes de la laringe mezclando los resultados con otras sublocalizaciones de la cabeza y el cuello.

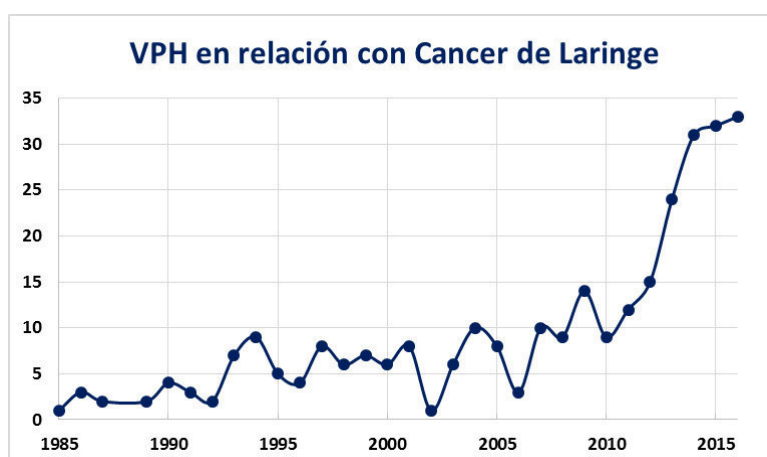


Figura 33. Distribución de artículos publicados acerca del VPH y el CEL desde 1984 a 2016, en Pubmed (www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed)

Relación del VPH ÚNICAMENTE con el Cáncer de Laringe

A partir de la cadena de búsqueda "(hvp[All Fields] AND ("laryngeal neoplasms"[MeSH Terms] OR ("laryngeal"[All Fields] AND "neoplasms"[All Fields]) OR "laryngeal neoplasms"[All Fields] OR ("larynx"[All Fields] AND "cancer"[All Fields]) OR "larynx cancer"[All Fields])) NOT (("larynx"[MeSH Terms] OR "larynx"[All Fields] OR "laryngeal"[All Fields]) AND ("papilloma"[MeSH Terms] OR "papilloma"[All Fields] OR "papillomas"[All Fields])) NOT ("papilloma"[MeSH Terms] OR "papilloma"[All Fields] OR "papillomatosis"[All Fields]) NOT ("mouth"[MeSH Terms] OR "mouth"[All Fields]) NOT ("oropharynx"[MeSH Terms] OR "oropharynx"[All Fields]) NOT ("pharynx"[MeSH Terms] OR "pharynx"[All Fields]) NOT ("Head Neck"[Journal] OR ("head"[All Fields] AND "and"[All Fields] AND "neck"[All Fields]) OR "head and neck"[All Fields]) NOT oesophageal[All Fields] AND "humans"[MeSH Terms]" se encontraron 159 artículos donde sólo se hablaba de series únicamente provenientes de laringe, y no heterogéneas con otras sublocalizaciones de la cabeza y el cuello.

VPH en relación con Cáncer de Laringe

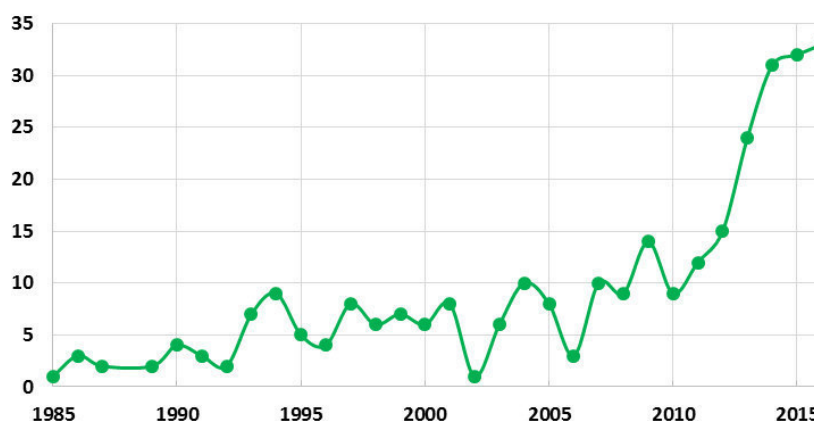


Figura 34. Distribución de artículos publicados acerca del VPH y el CEL, descartando heterogeneidad de grupos, desde 1984 a 2016, en Pubmed (www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed)

Relevancia del estudio del p16

Como se ha ido explicando previamente, la importancia de la proteína p16 es evidentemente creciente y, como reflejo de ello, el número de estudios que incluyen a la p16 como posible biomarcador de la actividad transcripcional del VPH en el cáncer, aumenta año tras año. Si se realiza una búsqueda simple en Pubmed (www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed) para el CECyC (*p16 AND head neck AND cancer*) y para el CEL (*p16 AND larynx* AND cáncer*) se obtuvieron 1841 artículos para el CECyC y 217 para el CEL, con la siguiente distribución (Figura 36 y 37):

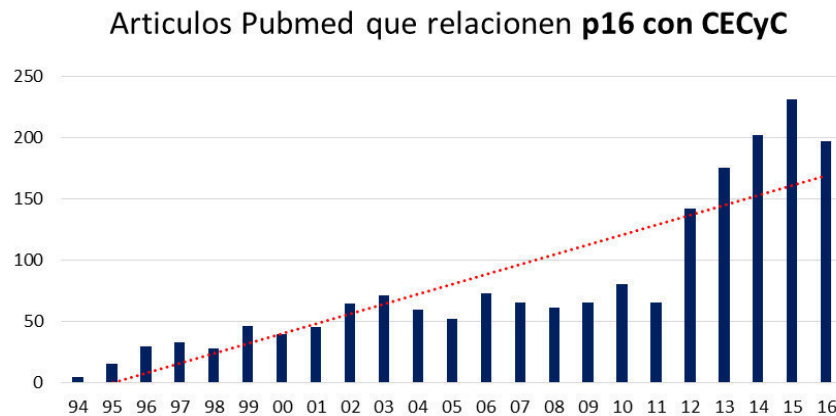


Figura 35. Tendencia creciente del número de artículos publicados e indexados en Pubmed (www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed), acerca del p16 en el CECyC, desde 1994 a 2016.

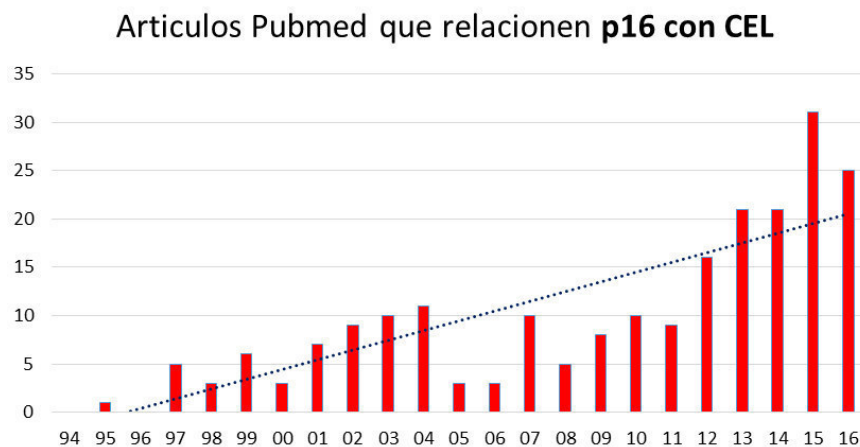


Figura 36. Tendencia creciente del número de artículos publicados e indexados en Pubmed (www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed), acerca del p16 en el CEL, desde 1994 a 2016.

Nacional (Acta Otorrinolaringológica Española)

Se realizó una búsqueda bibliográfica a través de la web de Elsevier (<http://zl.elsevier.es/es>) en la revista oficial de la SEORL-CCC, que incluye todos los artículos en formato .pdf desde 2001 hasta la actualidad, incluyendo avances de artículos aún no publicados. Se analizó el título, el *abstract* y el contenido del manuscrito.

Artículos acerca del VPH

Se utilizaron como cadena de búsqueda los términos papiloma*, VPH y HPV; excluyendo los artículos relacionadas con la papilomatosis laríngea, el papiloma invertido o las lesiones nasales. De este modo se encontraron diez artículos compatibles, que son ordenados en orden inverso de cronología:

- **Lesiones otorrinolaringológicas secundarias al sexo oral.** Claudia Fernández-López, Carmelo Morales-Angulo. Acta Otorrinolaringol Esp. 2016 Oct 25. DOI: 10.1016/j.otorri.2016.04.003
- **Resultados del tratamiento de los carcinomas epidermoides orofaríngeos mediante cirugía transoral.** Fernando López, José L. Llorente, César Álvarez-Marcos, Marta Morato, Carlos Suárez, Juan P. Rodrigo. Acta Otorrinolaringol Esp 2015;66:74-82
- **Colonización orofaríngea perinatal por el virus del papiloma humano.** Sánchez-Torices MS, Corrales-Millán R, Hijona-Elosegui JJ. Acta Otorrinolaringol Esp. 2015 Aug 11. pii: S0001-6519(15)00092-8. doi: 10.1016/j.otorri.2015.05.002
- **Tendencia de la incidencia del cáncer de laringe en un área sanitaria, entre los años 2007 y 2013.** G.J. Gómez Bernal, M. Bernal Perez, Dyego L. Bezerra de Souza, Eugenia Esteban Rodríguez, Alejandra Reboreda Amoedo, Rogelio Hernández Díaz. Acta Otorrinolaringol Esp 2015;66:127-31
- **Resultados oncológicos y funcionales del tratamiento no quirúrgico comparado con el quirúrgico en los carcinomas epidermoides de orofaringe.** Juan Pablo Díaz-Molina, Juan Pablo Rodrigo, César Álvarez-Marcos, Pilar Blay, Ángeles de la Rúa, Enrique Estrada, Ramón Alonso. Acta Otorrinolaringol Esp 2012;63:348-54
- **Resultados oncológicos y funcionales del tratamiento quirúrgico de los carcinomas de base de lengua.** Díaz Molina, Juan Pablo Rodrigo, José Luis Llorente, Álvarez Marcos, Carla Moreno, Suarez. Acta Otorrinolaringol Esp 2010;61:351-7
- **Marcadores biológicos de preservación de órgano.** Miguel Ángel Pavón, Matilde Parreño, Ramón Mangues. Acta Otorrinolaringol Esp 2009;60 Supl 2:25-33
- **Factores de riesgo de desarrollo de cáncer de laringe en la población adulta del Hospital Español de México.** Luz María Durán de Alba, Francisco Miguel Roa Castro. Acta Otorrinolaringol Esp 2008;59:367-70
- **Análisis de la mortalidad por cáncer laríngeo en Chile (1990-2004).** Mariana Elisa Bogado, Felipe Sebastián Araya, Faustino Tomás Alonso. Acta Otorrinolaringol Esp 2007;58:336-40
- **Relación entre el virus del papiloma humano y la amplificación del gen de la ciclina D1 en los carcinomas epidermoides de cabeza y cuello.** Rodrigo Tapia JP, García González LA, Alvarez Álvarez I, Cabanillas Farpón R, Suárez Nieto C. Acta Otorrinolaringol Esp. 2005 Nov;56(9):428-33.
- **Asociación entre la integración del virus humano y la pérdida de heterozigosidad del gen P53 en los carcinomas epidermoides de cabeza y cuello.** Martínez Ferreras A, Rodrigo Tapia JP, González Meana MV, Alvarez Álvarez I, Coto E, Suárez Nieto C. Acta Otorrinolaringol Esp. 2001 Oct;52(7):546-52.
- **Alteraciones moleculares en los carcinomas epidermoides de la orofaringe.** Rodrigo Tapia JP, Suárez Nieto C, Sánchez Lazo P, Ramos S, Coto E, Alvarez V, Alvarez Álvarez I, García González LA, Martínez Sánchez JA. Acta Otorrinolaringol Esp. 2001 Jan-Feb;52(1):24-31.

Artículos acerca del p16

Se utilizó como cadena de búsqueda el término p16 excluyendo artículos relacionados con los tumores nasosinusales. De este modo solamente se encontraron dos artículos que son ordenados en orden inverso de cronología:

- **Lesiones otorrinolaringológicas secundarias al sexo oral.** Claudia Fernández-López, Carmelo Morales-Angulo. Acta Otorrinolaringol Esp. 2016 Oct 25. DOI: 10.1016/j.otorri.2016.04.003
- **Tratamiento quirúrgico de los carcinomas escamosos de cabeza y cuello en España durante el periodo 2006-2011.** Xavier León Vintró, María T. Sánchez-Santos, Manel Mañós Pujol, Juan Jesús Herranz González-Botas, Francisco Esteban Ortega, Julio Nogués Orpí. Acta Otorrinolaringol Esp 2015;66:98-105

Nacional (Congreso de la SEORL-CCC)

Gracias a la secretaría de la SEORL-CCC pudo accederse a los programas de los congresos de la misma, que se encuentran archivados de manera digital desde el año 2008 (59ª Edición).

VPH en general

Con la cadena de búsqueda múltiple en base a las palabras VPH, HPV, papiloma*, excluyendo las comunicaciones relacionadas con la palabra papiloma invertido, se encontraron 43 referencias (3 mesas redondas, 15 comunicaciones orales y 30 comunicaciones póster) (Figura 37). De éstas, el 67,44% se referirían a la papilomatosis laríngea.

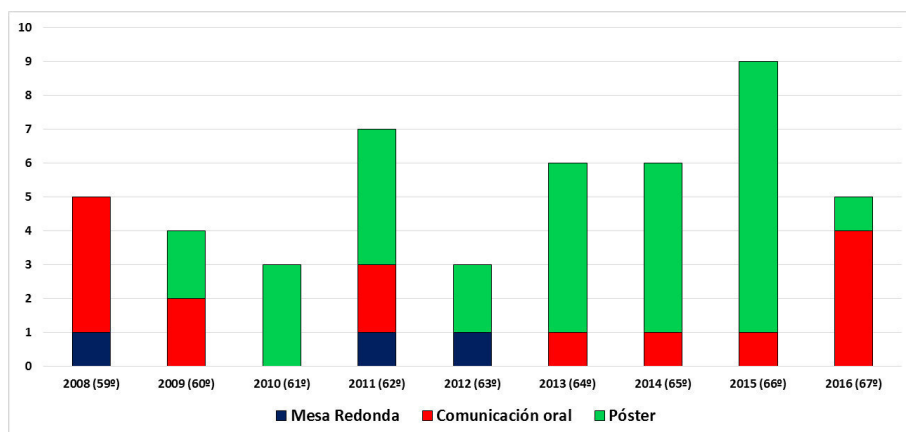


Figura 37. Distribución de las conferencias científicas que versaban sobre el VPH, incluyendo a la papilomatosis laríngea, en los congresos de la SEORL-CCC desde 2008 a 2016.

VPH sin papilomatosis laríngea

Excluyendo a la papilomatosis laríngea como tema de interés de la mesa redonda o comunicación científica se encontraron sólo 16 relacionadas directamente con el VPH y su relación con el carcinoma de área ORL.

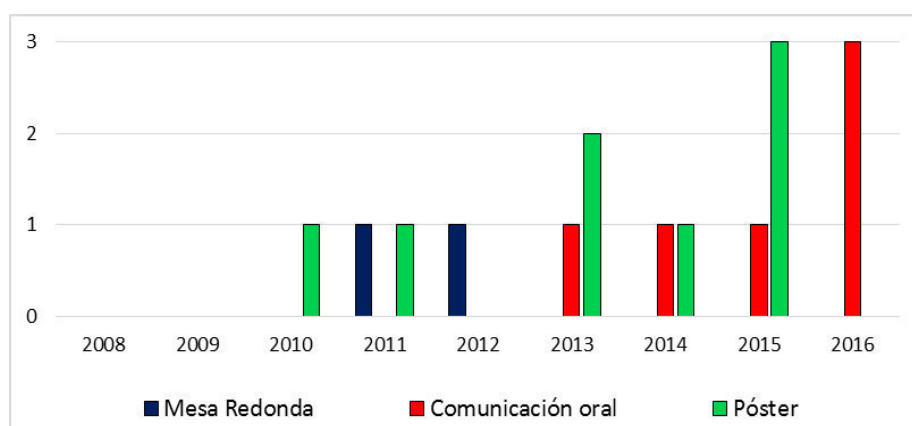


Figura 38. Distribución de las conferencias científicas que versaban sobre el VPH, sin incluir a la papilomatosis laríngea, en los congresos de la SEORL-CCC desde 2008 a 2016.

A continuación se enumeran las referencias científicas recogidas en los Congresos de la SEORL-CCC desde 2008, en los que expresamente se relaciona el VPH con el desarrollo de carcinoma en algún área otorrinolaringológica.

61 CN SEORL (2010):

- Comunicación Póster: **VPH en el carcinoma escamoso de cavidad oral y orofaringe**. Callejo Castillo, Clemente, Samarà Piñol, Inés Giordano, Palomino Meneses, Mañós Pujol.

62 CN SEORL (2011):

- Mesa Redonda: **HPV and head and neck cancer**. Gómez Serrano, Valentin Tomazic, Leemans, Haughey, Psyrri, Hoffmann, Cabanillas Farpon, Klozar
- Comunicación Póster: **Human Papilloma Virus in tonsillar squamous cell carcinoma: The Wessex experience**. Ward, Frampton, Thomas, King.

63 CN SEORL (2012):

- Mesa Redonda: **HPV y cáncer de cabeza y cuello**. Buvanesh Singh Ehaby, de Vicente Rodríguez, García Pedrero, Álvarez Marcos.

64 CN SEORL (2013):

- Comunicación Oral: **Estudio de incidencia de carcinomas epidermoides de orofaringe asociados al HPV en el norte de España (1990-2009)**. García Velasco, García-Pedrero, Hermesen, Fresno, Díaz-Molina, Rivas Castillo, Martínez González, Suárez Nieto, Rodrigo Tapia.
- Comunicación Póster: **Implicaciones pronósticas del VPH en el cáncer orofaríngeo**. Sánchez Torices, Corrales Millán, Moñux Martínez
- Comunicación Póster: **Virus del Papiloma Humano y cáncer de orofaringe**. Castro Macía, Vaamonde Lago, Meléndez García, Araujo Da Costa, Ribera Schmith, Pallas Pallas, González Cortés, San Martín, Araujo Nores

65 CN SEORL (2014):

- Comunicación Oral: **Prevalencia de HPV en Carcinomas Epidermoides de laringe e hipofaringe.** García Velasco, García Pedrero, Hermesen, Suárez Nieto, Rivas Castillo, Salom Lucena, Rodrigo Tapia.
- Comunicación Póster: **Virus del Papiloma Humano y Carcinoma Basaloide de laringe.** Isorna Retamino, González Hidalgo, Pereira Teodoro, Herreros Sánchez, Anguita Sánchez, Guillen Guerrero, Urbano Urbano, Paulino Herrera, Martínez Sempere.

66 CN SEORL (2015):

- Comunicación Oral: **Prevalencia del Virus del Papiloma Humano en el Carcinoma Epidermoide de Laringe: Resultados de estudio retrospectivo en 123 pacientes.** Alvaro Sanchez Barrueco, Gisela Risson Pino, José Antonio Brandáriz Castelo, Carlos Almodóvar Alvarez.
- Comunicación Póster: **Importancia del Virus Papiloma Humano en el Cáncer Epidermoide faringolaríngeo.** Juan Pablo Pelegrín Hernández; Patricia Pastor Costa, Alexandra Castillo Burns, Alejandra Pérez Ferrando, Rocío Arce Martínez, José Antonio Díaz Manzano, José Miguel Osete Albadalejo, Diego Hellín Meseguer, Alfonso Medina Banegas
- Comunicación Póster: **Detección del Virus del Papiloma Humano en tumores ORL.** Pla-Gil, Ignacio; Alfaro, C; Redondo, J; Pérez-Carbonell, T; Rincón Piedrahita, I; Borrero, V; Marco Algarra, J.
- Comunicación Póster: **Infección por HPV y amplificación de la región 11q13 en los Carcinomas Epidermoides de Orofaringe.** María Cecilia Salom Lucena; Esteban Pacheco, Fabián García, Sofía Tirados, Ángeles Villaronga, Juana María García Pedrero, Juan Pablo Rodrigo, José Luis Llorente.

66 CN SEORL (2016):

- Comunicación Oral: **Segundas neoplasias en pacientes con carcinomas de orofaringe en función del estatus HPV.** Alberto Codina Aroca, Antonio Rigo Quera, María Martel, Laia Alemany, Marisa Mena, Miren Taberna, Silvia Bagué, Miquel Quer, Xavier León
- Comunicación Oral: **Epidemiología y pronóstico del virus del papiloma humano asociado a carcinoma de orofaringe en una cohorte de pacientes.** María Martel-Martín, Xavier León-Vintró, Laia Alemany, Miren Taberna, José M. Costa-González, Miquel Quer-Agustí.
- Comunicación Oral: **Pérdida de la capacidad pronóstica de la afectación regional en los pacientes con carcinomas de orofaringe HPV+.** José Miguel Costa, María Martel, Laia Alemany, Marisa Mena, Xavier Castellsagué, Miquel Quer, Xavier León.

p16

Se utilizaron las palabras p16, transcrip* y trascrip*, sin encontrar referencia alguna en los programas de los congresos de la SEORL-CCC, que se encuentran de manera digital desde el año 2008 (59ª Edición) al 2016.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS DEL ESTUDIO

Hipótesis de trabajo

En base a la bibliografía revisada hasta 2010, se establecieron una serie de hipótesis de trabajo.

- La prevalencia de VPH en el CEL-G alcanza el 25-35%(12, 14-20, 26)
- La presencia del p16 en el CEL-G es de 25-30%(276, 318)
- La prevalencia del p16 es mayor en las muestras VPH +(318).
- El serotipo más frecuente es el VPH16(14-16, 29).
- Teniendo en cuenta el aumento de la transmisión del virus en las últimas décadas, la prevalencia del VPH en el CEL-G presenta una tendencia creciente(8, 110, 113, 270).
- La presencia del VPH no tiene influencia en la supervivencia global y/o libre de enfermedad(16, 19, 316).
- Los pacientes VPH + y p16 + presentan una supervivencia global y libre de enfermedad a los 5 y 10 años mayor que las cohortes VPH -(37).
- Los pacientes con tumores VPH dependientes presentan una menor frecuencia de hábito tabáquico-alcohólico(55, 294).

Objetivos

Principales

- **Demostrar la presencia del VPH** en el CEL-G.
- **Determinar la presencia del p16** en el CEL-G.

Secundarios

- **Demostrar la implicación activa del VPH** mediante el análisis de su actividad transcripcional (estudio de la proteína p16) y **compararla con la prevalencia del virus obtenida**.
- **Analizar la presencia del VPH en el CEL-G a lo largo del tiempo**.
- **Describir los serotipos encontrados** y comparar su prevalencia con otras series publicadas.
- **Valorar el efecto carcinogénico VPH como factor único o como cofactor** junto al p16, alcohol o tabaco.
- **Estudiar factores epidemiológicos y su implicación en la supervivencia** del CEL-G.
- **Establecer cohortes de carcinomas en función de la positividad al VPH y al p16** y los factores determinantes para la pertenencia a una cohorte o a otra, **y su influencia en las supervivencias global y/o libre de enfermedad**.
- **Estudiar factores propios del tumor** y su implicación en la supervivencia del CEL, de origen glótico (subtipo histológico, origen y tamaño tumoral, afectación ganglionar, estadio tumoral, recidiva y lugar de recidiva).
- **Estudiar las supervivencias global y libre de enfermedad**, con al menos 10 años de seguimiento, del CEL-G.

MATERIAL Y MÉTODOS

Financiación y grupo de trabajo

En julio de 2010 se obtuvo la beca para la realización del estudio dentro de la *VII Convocatoria de Ayudas a Proyectos de Investigación en Salud*, promovida por la Fundación Mutua Madrileña. El proyecto con el nombre “*Estudio de la prevalencia e implicación del Virus del Papiloma Humano en el Carcinoma Epidermoide de cuerda vocal*” fue presentado con el Dr. Carlos Almodóvar Álvarez (Jefe de Servicio ORL, Hospital 12 de Octubre (H12O)) como investigador principal; y los doctores Claudio Ballestín Carcavilla (Médico Adjunto, Servicio de Anatomía Patológica, H12O), José Antonio Brandáriz Castelo (Jefe de Sección, Servicio de ORL, H12O), Sofía Fernández Hernández (Servicio de Anatomía Patológica, H12O), Purificación Magán Tapia (Médico Adjunto, Servicio de Estadística y Epidemiología, H12O), Gisela Risson Pino (Servicio de ORL, H12O) y Álvaro Sánchez Barrueco (Servicio de ORL, H12O). Con posterioridad, Purificación Magán fue sustituida por David Lora Pablos, del Instituto de Investigación del H12O, CIBERESP (imas12).

Diseño del estudio

Se decidió, a través de un estudio descriptivo retrospectivo, contrastar durante un tiempo significativo la presencia del VPH y la positividad a la proteína p16 en una población homogénea, como es la consistente de muestras de CEL-G. En base a la positividad o negatividad de dichos biomarcadores se confeccionaría unas cohortes globales (muestras VPH o p16, positivas o negativas) o específicas (cruce de positivities y negatividades). De esta manera la cohorte 1.1 correspondería a muestras VPH – y p16 –, la cohorte 1.2 correspondería a muestras VPH – y p16 +, la cohorte 2.1 correspondería a muestras VPH + y p16 –, mientras que la cohorte 2.2 correspondería a muestras VPH + y p16 +.

La pertenencia a una u otra cohorte global o específica se relacionaría con factores epidemiológicos, quirúrgicos, tumorales y de supervivencia; con el objetivo de determinar la presencia de algún factor relacionado o determinante.

Criterios inclusión/exclusión

Criterios de inclusión

- a. Muestras de origen glótico con resultado positivo para CE pertenecientes tanto a hombres como a mujeres.
- b. Pacientes con diagnóstico y tratamiento dentro del periodo de estudio (1977-2005)

- c. Pacientes únicamente tratados con cirugía como primer tratamiento, con otros posibles tratamientos tras la recidiva (cirugía, QT y/o RT).

Criterios de exclusión

- a. Origen laríngeo, del carcinoma epidermoide, distinto al glótico.
- b. Diagnóstico anatomopatológico de las muestras compatible con neoplasia benigna, carcinoma “in situ” o carcinomas no epidermoides (verrucosos, adenocarcinomas, células fusiformes, adenoma quístico, basaloides, etc.).
- c. Diagnóstico o tratamiento fuera del período del estudio (antes de 1977 o después de 2005).
- d. Tumores tratados previamente o solamente con radioterapia y/o quimioterapia.

Tamaño muestral

El tamaño muestral necesario para determinar la prevalencia de VPH en el CEL-G con un nivel $\alpha=0,05$ y con una precisión absoluta del 5% (similar a revisiones previas(27)), se estimó en **209 muestras**.

Todas las muestras fueron seleccionadas bajo un muestreo aleatorio simple de la base de datos oncológica del Servicio de ORL del H12O desde 1977 a 2005, siguiendo las directrices del Comité de Ética de Investigación de dicho hospital. En 2005, esta base de datos incluía 2831 pacientes con neoplasias de cabeza y cuello, de los cuales 847 eran de origen glótico.

Procesamiento de las muestras

Aplicando los criterios de inclusión y exclusión anteriormente descritos, se analizaron las muestras archivadas en el Archivo del Servicio de Anatomía Patológica del H12O en parafina y formol (FFPE, *formalin-fixed paraffin embedded*), correspondientes a CEL-G de origen glótico.

La extracción de ADN fue llevada a cabo con el kit Clart HPV2 (Genómica, Madrid, España). Ésta es una técnica de diagnóstico molecular del ADN viral usando PCR multiplex y una subsecuente visualización en *arrays* de baja densidad. Con ello se aseguró la posible detección y determinación del genotipo de 35 diferentes tipos de VPH, tanto de bajo riesgo (6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 62, 71, 72, 81, 83, 84, 89) como de alto riesgo oncogénico (16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 70, 73, 82 y 85). Todos los pasos se realizaron de acuerdo con el protocolo del fabricante.

Adicionalmente, a dichas muestras, se les aplicó el estudio inmunohistoquímico de la proteína p16. En muestras con material representativo seleccionado de los bloques de parafina se utilizó el anticuerpo del Laboratorio Roche (Ventana p16 CINtec, 50% de dilución y 20 minutos de incubación) usando un sistema automatizado Leica (Bond), basado en un polímero de dextrano y biotina avidina, revelado con diaminobencidina. Como control negativo se utilizaron muestras de tejido de la laringe de

pacientes con patología no oncológica, y como control positivo, muestras de pacientes con CE p16 + de cuello del útero. Se estableció la sobreexpresión de p16 en un punto de corte para la positividad de más de un 70%, con el fin de eliminar los casos con inmunoreactividad focal y no homogénea, o desigual.

La revisión de los resultados fue llevada a cabo de forma independiente por dos patólogos para la verificación del diagnóstico.

De las 209 muestras necesarias, 86 se consideraron no viables para el estudio porque no era posible realizar el estudio inmunohistoquímico y/o de análisis PCR del ADN viral; siendo, por tanto, viables 123 muestras (58,85%). Esta falta de viabilidad se cree debida a fallos en la conservación de la muestra y al tiempo de evolución de las mismas, algunas de las cuales llevaban guardadas hasta 30 años.

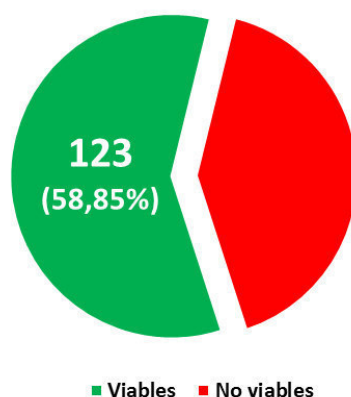


Figura 39. Relación de muestras anatomopatológicas viables para el estudio del VPH y p16, sobre 209 del total.

Variables contempladas

Las variables que se estudiaron fueron:

- Epidemiológicas:
 - Año de diagnóstico: Desde 1977 a 2005
 - Sexo
 - Edad al diagnóstico
 - Profesión: Según la Clasificación Nacional de Actividades Económicas(354)
 - Síntoma de consulta y tiempo de evolución
 - Consumo de tabaco (cigarros/día)
 - Consumo de alcohol (unidades de alcohol/día)
 - Información sobre hábitos sexuales y neoplasias genitales conyugales

- Quirúrgicas
 - Grado histológico de Carcinoma Epidermoide (132):
 - Bien diferenciado
 - Moderadamente diferenciado.
 - Pobremente diferenciado.
 - Microinvasivo o microinfiltrante.
 - Cirugía realizada: La cirugía fue seleccionada tras la confirmación anatomopatológica de la sospecha oncológica y las características TNM del tumor. Todo ello fue consensuado en Sesión Clínico-Oncológica formada por los Servicios de Anatomía Patológica, Oncología médica, Oncología radioterápica, Radiodiagnóstico y ORL. Las cirugías realizadas se clasificaron en:
 - *No funcionales* (Laringectomía total y Laringectomía *Near Total*),
 - *Funcionales*
 - No Supraselectivas (vaciado endolaríngeo, hemilaringuectomía, frontal o frontolateral simples o ampliada)
 - Supraselectivas (cordectomías uni o bilaterales, abiertas o láser).
 - Tamaño tumoral (T)
 - Afectación ganglionar (N)
 - Afectación a distancia o metástasis (M)
 - Estadío tumoral (TNM): según los criterios de la AJCC(137)
- Datos obtenidos en el estudio
 - Presencia del VPH
 - Serotipo de VPH
 - Oncogenicidad asociada al serotipo VPH: según los criterios de Muñoz(210) puede establecerse la clasificación de los serotipos de VPH en función de su riesgo oncológico

Grado de Certeza	Serotipos VPH
Alto riesgo Establecido	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59
Alto riesgo Probable	26, 53, 66, 68, 73, 82
Bajo Riesgo Establecido	6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81

Tabla 10. Grado de oncogenicidad de los serotipos VPH (extraído de Muñoz et al. *Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. N Engl J Med. 2003 Feb 6;348(6):518-27.*)

- Presencia de p16

- Correlación entre presencia de VPH y de p16: cohorte asignada
- Supervivencia
 - Presencia de recidiva
 - Localización de la recidiva
 - Supervivencia global, relacionada con:
 - Datos epidemiológicos
 - Datos del TNM (tamaño, afectación ganglionar y metástasis)
 - VPH, p16 y cohortes VPH/p16 asociadas
 - Localización de la recidiva
 - Supervivencia libre de enfermedad
 - Datos epidemiológicos
 - Datos del TNM (tamaño, afectación ganglionar y metástasis)
 - VPH, p16 y cohortes VPH/p16 asociadas

Análisis estadístico

El diseño estadístico fue llevado a cabo por Purificación Magán Tapia y el análisis estadístico de los resultados por David Lora Pablos, ambos pertenecientes al Servicio de Estadística y Epidemiología del H12O (Unidad de Investigación Clínica, CIBERESP, i+12).

Las variables cualitativas se presentaron con su distribución de frecuencias o distribución absoluta. Las variables cuantitativas se expresaron mediante la media o mediana, y desviación estándar con intervalo de confianza al 95% o rango intercuartílico. Estas variables se compararon con los cualitativos del porcentaje absoluto y relativo y la prueba de Chi-cuadrado.

La prevalencia en el tiempo del VPH y/o p16, o sus respectivas cohortes, se estudió estableciéndose grupos de tiempo. Dichos grupos se basaron en una distribución de pacientes por cuartiles (1978-1992, 1993-1995, 1996-1997, 1998-2005) o en grupos de tiempo igualitarios (1978-1984, 1985-1991, 1992-1998, 1999-2005).

Los datos fueron estratificados para los pacientes VPH + y -, p16 + y -, y para la interrelación entre ambos, denominados cohortes (1.1 para VPH- p16-, 1.2 para VPH- p16+, 2.1 VPH+ y p16-; y 2.2 VPH+ y p16+), y sus distribuciones se compararon con la variable cuantitativa con la prueba t de Student, en distribuciones normales, o prueba de Wilcoxon, en las distribuciones no normales; y para las variables categóricas con la prueba de chi-cuadrado.

El análisis de supervivencia se realizó mediante regresión de Cox y el método de Kaplan-Meier. Se utilizó el Log-rank test para determinar si las diferencias observadas en dos o más curvas de supervivencia se podrían atribuir a la casualidad. En este ensayo, el número de eventos (muerte,

fracasos) en cada grupo se compararon con el número de pérdidas que se podrían esperar en los grupos combinados. Se utilizó la prueba de Chi-cuadrado para analizar las pérdidas observadas y esperadas. Se establecieron valores de supervivencia global (tiempo desde la fecha del diagnóstico a la fecha de la muerte o de la última fecha de seguimiento) y supervivencia libre de enfermedad (tiempo desde la fecha del diagnóstico a la aparición de algún tipo de recurrencia o recidiva)

Seguimiento

De acuerdo con los objetivos del estudio, el seguimiento potencial de las muestras fue mínimamente de 10 años, alcanzando una mediana de seguimiento de 18,39 años.

RESULTADOS

Debido al diseño del estudio, se seleccionaron muestras hasta 2005, para asegurar un estudio de supervivencia mínimo de 10 años; hasta 2015. Dado que se seleccionaron muestras desde 1978, dicho seguimiento en muchos casos fue superior a 10 años, obteniendo una **media de seguimiento de 18,39 años**.

A continuación se detallan los resultados del estudio, los cuales están aglutinados en las tablas referenciadas al final del subcapítulo de Resultados.

Epidemiológicos

Año de diagnóstico y distribución histórica

Tras aplicar un muestreo aleatorio sobre la base de datos oncológica general, aplicando los criterios de inclusión y exclusión, fueron seleccionadas 209 muestras, cuya distribución por año de diagnóstico fue la observable en la Figura 40:

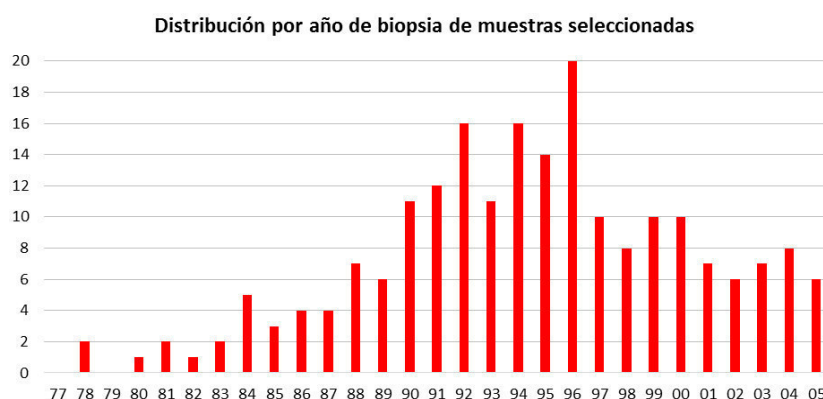


Figura 40. Distribución de las muestras de CEL-G seleccionadas para el estudio, por año de diagnóstico

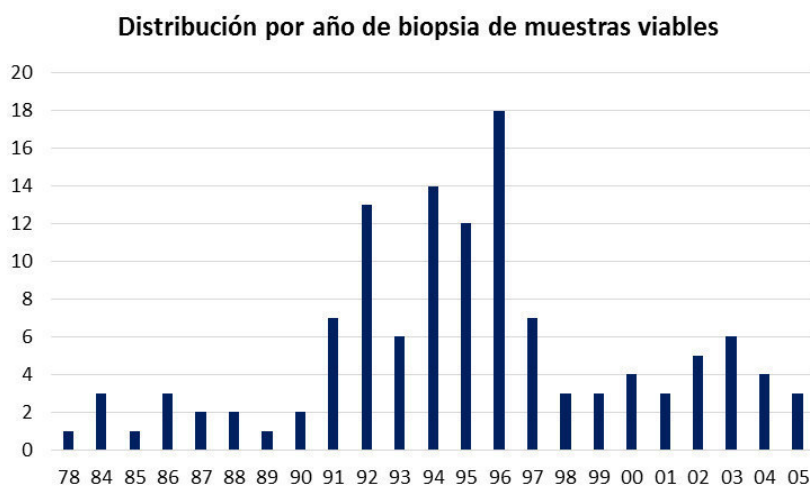


Figura 41. Distribución de las muestras de CEL-G, viables para el estudio, por año de diagnóstico

Una vez aplicado el estudio de viabilidad (permisividad al estudio del VPH y proteína p16), sólo resultaron viables 123 muestras, con la siguiente distribución por año de diagnóstico (Figura 41).

En base a la distribución por cuartiles, se establecieron cuatro grupos en función del año de diagnóstico: 1978-1992, 1993-1995, 1996-1997 y 1998-2005; útil para el estudio de la evolución de la presencia del VPH, p16 o sus respectivas cohortes, a lo largo del tiempo. Sin embargo, esta división proporcionaba grupos levemente asimétricos, por lo que fue estudiada otra distribución adicional, más igualitaria en función del tiempo: 1978-1984, 1985-1991, 1992-1998 y 1999-2005. Por tanto, fue estudiada la presencia del VPH y el p16 a lo largo del tiempo, en base a dos distribuciones:

- **Distribución 1** (en base a cuartiles):
 - 1978-1992 (n=35)
 - 1993-1995 (n=32)
 - 1996-1997 (n=25)
 - 1998-2005 (n=31)
- **Distribución 2** (en base a grupos igualitarios de tiempo):
 - 1978-1984 (n=4)
 - 1985-1991 (n=18)
 - 1992-1998 (n=73)
 - 1999-2005 (n=28)

Sexo

Todas las muestras pertenecían a pacientes del **sexo masculino**. Como se ha comentado anteriormente en Material y Métodos, sólo el 2,37% (n=67) de las muestras de toda la base de datos del Servicio de ORL (n=2831) correspondían a mujeres. Acotando los datos a la glotis, de las 847 muestras estudiables, sólo el 0,83% (n=7) correspondían a mujeres. Por ello, resulta coherente que en el proceso de muestreo aleatorio no se seleccionara ninguna muestra perteneciente a pacientes de sexo femenino.

Edad al diagnóstico

La edad media al diagnóstico de los pacientes recogidos en la muestra fue **62,31 ± 11.07 años (rango 33-86)**. Dicha edad media al diagnóstico resulta coherente con la general de la base de datos (n=2831) en donde la edad media de los hombres de la base de datos es 59,54 años (rango 24-92).

La edad al diagnóstico no supuso un factor determinante en el tamaño tumoral (p=0,478), la afectación ganglionar (p=0,158), el estadio tumoral (p=0,333) y la presencia de recidiva (p=0,8) o el tipo de recidiva (local, ganglionar o a distancia) (p=0,788).

Profesión

Los datos relacionados a la ocupación de los pacientes no fueron recogidos en el 51,22% (n=63). De aquellos casos en los que fue recogido, las profesiones más habituales se enmarcaban dentro del sector de la construcción (11,38%, n=14), minería y/o metalurgia (9,76%, n=12), administración (7,32%, n=9), comercio (4,88%, n=6), mecánica (4,88%, n=6) o transporte (3,25%, n=4).

Siguiendo la Clasificación Nacional de Actividades Económicas, CNAE(354), que permite la clasificación y agrupación de las unidades productoras según la actividad que ejercen, los datos se agruparon en diferentes actividades:

- Actividades administrativas y servicios auxiliares (13%, n=16)
- Actividades sanitarias y de servicios sociales (2,44%, n=3)
- Administración pública y defensa (0,81%, n=1)
- Agricultura, ganadería, silvicultura y pesca (0,81%, n=1)
- Construcción (13,82%, n=17)
- Comercio al por mayor y al por menor; reparación de vehículos de motor y motocicletas (4,88%, n=6)
- Industrias extractivas (9,76%, n=12)
- Transporte y almacenamiento (3,25%, n=4)

No se evidenció una relación significativa entre el CNAE y el tamaño tumoral ($p=0,593$), la afectación ganglionar ($p=0,376$) o el estadio tumoral al diagnóstico ($p=0,407$).

Síntoma de consulta y tiempo de evolución

Los síntomas por los que los pacientes acudieron a la consulta fueron recogidos en todos los casos, siendo principalmente la disfonía el síntoma predominantemente referido (96,75%, n=119); congruente con el origen glótico de los CE estudiados.

El tiempo de evolución del síntoma fue recogido en la mayoría de los casos (85,36%, n=105), encontrándose un tiempo de evolución medio de los síntomas de 8,27 ($\pm 10,59$) meses [rango 1-60].

El tiempo de evolución del síntoma no presentó relación con el tamaño tumoral ($p=0,224$), la afectación ganglionar ($p=0,276$) o el estadio al diagnóstico ($p=0,185$).

Consumo de tabaco

De todos los pacientes, un 89,43% (n=111) reconocieron ser fumadores, con un consumo medio de tabaco de 29,5 ($\pm 15,81$) cig/día. De toda la muestra 3 pacientes reconocieron ser no fumadores y en 12 pacientes no se encontró referencia a este dato en su historia clínica.

El consumo de tabaco no supuso un factor determinante en el tamaño tumoral ($p=0,146$), la afectación ganglionar ($p=0,699$) o el estadio tumoral al diagnóstico ($p=0,121$); ni con la aparición de recidivas ($p=0,801$), la presencia del VPH ($p=0,427$) o de p16 ($p=0,782$).

El consumo de tabaco no resultó ser un factor determinante en la supervivencia libre de enfermedad ($p=0,438$) pero **si resultó ser un factor determinante en la supervivencia global ($p=0,008$) con un *hazard ratio* de 1,028606**; es decir, por cada cigarrillo que el paciente reconocía fumar al día, el riesgo de fallecer incrementaba un 2,8%.

Consumo de alcohol

De todos los pacientes, un 61,78% ($n=76$) reconocieron ser consumidores de alcohol de manera diaria, con un consumo medio de 2.64 ($\pm 0,87$) unidades de alcohol por día. Por el contrario, 16 pacientes reconocieron no consumir diariamente alcohol, frente a 31 pacientes en los cuales no se registró ningún dato al respecto del consumo de alcohol. El consumo de alcohol registrado no supuso un factor significativo en la supervivencia global ($p=0,403$) o libre de enfermedad ($p=0,211$). De igual modo, no resultó ser un factor determinante en la presencia de recidivas ($p=1,00$).

No se evidenció una relación significativa entre el consumo de alcohol y el tamaño tumoral ($p=0,3536$), la afectación ganglionar ($p=0,4272$) o el estadio tumoral al diagnóstico ($p=0,2598$).

Probablemente la ausencia de datos en un número significativo de casos (25,2% de la muestra) sea debida a una falta de protocolización en la confección de la historia clínica y una ausencia de conciencia social del verdadero consumo de alcohol.

Información sobre hábitos sexuales y neoplasias genitales conyugales

La base de datos del H120, a la fecha de obtención de información, no presentaba cuestionario validado sobre datos epidemiológicos de origen sexual o sobre neoplasias genitales de la pareja del paciente, por lo que no se dispuso de dicha información. No obstante la inclusión de dicha información, en un futuro, puede ser muy interesante.

Relacionados con el tumor

Origen

De acuerdo con el diseño del estudio, todas las muestras fueron glóticas. De toda la muestra de la base de datos ($n=2831$) 847 eran de origen glótico.

Tal y como puede observarse en la Figura 42, los orígenes de los carcinomas se establecieron en una de las cuerdas vocales (derecha o izquierda), en ambas o en las comisuras anterior o posterior. Las

localizaciones más frecuentes fueron la CVD (45,53%, n=56) y CVI (40,65%, n=50). En 8 casos (6,5%) el origen era en ambas cuerdas vocales, simultáneamente. Por otro lado, la comisura anterior supuso el origen en el 7,32% (n=9), mientras que la posterior sólo el 0,81% (n=1).

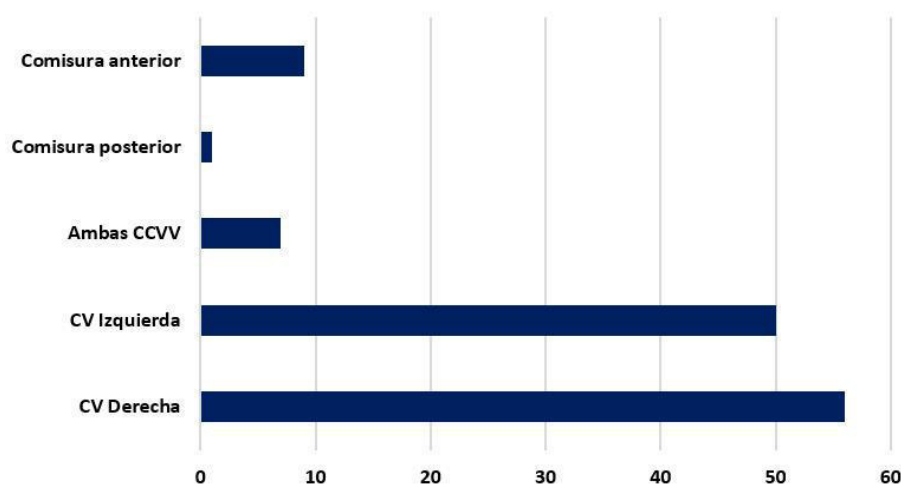


Figura 42. Relación del origen tumoral de las muestras de CEL-G viables para el estudio

Histología del tumor

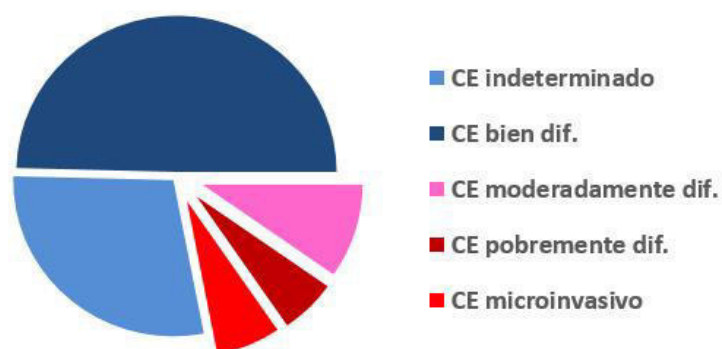


Figura 43. Relación de grados histológicos encontrados en las muestras de CEL-G viables para el estudio

Como se detalla en el diseño del estudio, uno de los criterios de inclusión era tener en cuenta solamente las muestras positivas para CE, descartando aquellos diagnósticos distintos como tumores benignos, carcinomas *in situ* o malignos NO epidermoides (verrucosos, adenocarcinomas, células fusiformes, adenoma quístico, etc.).

En un 28,46% (n=35) no se estudió específicamente el grado de diferenciación. En el resto el análisis anatomopatológico reveló muestras bien diferenciadas (49,59%, n=61), moderadamente diferenciadas (9,76%, n=12), pobremente diferenciadas (5,69%, n=7) o carcinomas epidermoides microinvasivos en un 6,5% (n=8) (Figura 43).

Tamaño tumoral (T)

El tamaño tumoral al diagnóstico fue mayoritariamente T1a (52,03%, n=64); es decir, cuando la afectación se circunscribía a una sola cuerda vocal (Figura 44).

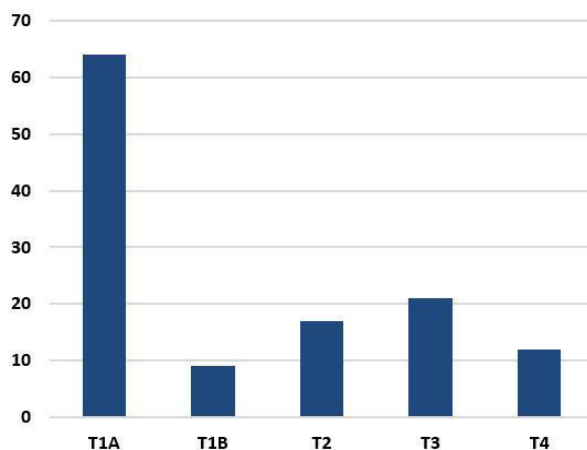


Figura 44. Relación del tamaño tumoral al diagnóstico de las muestras de CEL-G viables para el estudio

El resto de las muestras fueron clasificadas como:

- T1b: Afectación de ambas cuerdas vocales (7,32%, n=9)
- T2: Extensión a la supra o subglotis, o con disminución (no fijación) de la cuerda vocal (13,82%, n=17)
- T3: Localización del tumor limitado a la laringe con fijación de la cuerda vocal o invasión del espacio paraglótico; o afectación del pericondrio interno del cartílago tiroides (17,07%, n=21)
- T4: Invasión del cartílago o tejidos extralaringeos; o del espacio prevertebral, estructuras mediastínicas o carótida interna (9,76%, n=12).

El tamaño tumoral no se vio influenciado por el consumo de tabaco ($p=0,146$) o alcohol ($p=0,354$); la edad al diagnóstico ($p=0,478$) o el tiempo de evolución de los síntomas ($p=0,224$).

Afectación ganglionar (N)

De las muestras analizadas, la mayoría (95,93%, n=118) no presentaron **ningún ganglio afectado (N0)** (Figura 45).

El resto correspondieron a N1, metástasis en un solo ganglio linfático homolateral <3 cm (0,81%, n=1); a N2a, metástasis única en un solo ganglio linfático homolateral >3 y <6 cm (0,81%, n=1); a N2b, metástasis ganglionares ipsilaterales múltiples, todas <6 cm (0,81%, n=1); o N2c, metástasis bilaterales o contralaterales <6 cm (1,63%, n=2). No se encontró ninguna muestra correspondiente a estadio ganglionar N3.

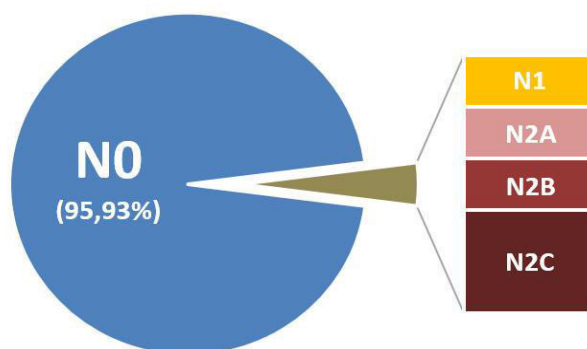


Figura 45. Relación de la afectación ganglionar al diagnóstico de las muestras de CEL-G viables para el estudio

La afectación ganglionar no se vio influenciada por el consumo de tabaco ($p=0,6992$) o alcohol ($p=0,4272$); por la edad al diagnóstico ($p=0,158$) o por el tiempo de evolución de los síntomas ($p=0,276$).

Estadio tumoral

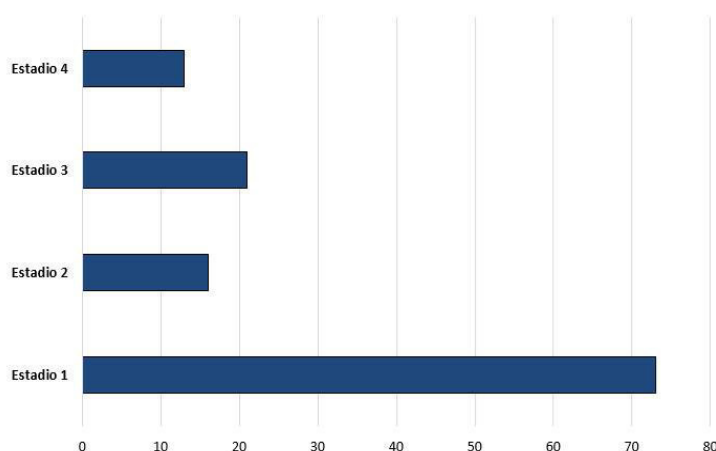


Figura 46. Relación del estadio tumoral al diagnóstico de las muestras de CEL-G viables para el estudio

En función de los datos correspondientes al tamaño tumoral (T), a la afectación ganglionar (N) y a la presencia de metástasis a distancia (M) se establece el estadio tumoral. En las muestras seleccionadas, la mayoría se situaban en un estadio I (59,35%, $n=73$), de manera coherente con el tamaño y la afectación ganglionar encontrada, previamente detallada.

El resto de las muestras correspondieron al estadio II (13,01%, $n=16$), estadio III (17,07%, $n=21$) y estadio IV (10,57%, $n=13$)

No se evidenció una relación significativa entre el estadio tumoral y la edad al diagnóstico ($p=0,333$), el consumo de tabaco ($p=0,121$) o de alcohol ($p=0,259$); o el tiempo de evolución de los síntomas referidos ($p=0,185$).

Respuesta al tratamiento

Se llevó a cabo un seguimiento de al menos 10 años, que finalizó en Diciembre de 2015. Durante el seguimiento de los pacientes, se evaluó la respuesta postoperatoria mediante laringoscopia y palpación cervical, cada mes durante el primer año, cada dos meses el segundo, cada tres meses el tercer año, y trimestralmente hasta los 10 años; completando con una exploración radiológica según las guías clínicas.

En función de las incidencias durante el seguimiento pudo darse el fin de seguimiento (por fuga o por muerte), la aparición de tumores relacionados con el carcinoma estudiado o la curación del paciente. De este modo, los pacientes fueron clasificados como:

- **Fuga** (31,71%, $n=39$): Aquellos pacientes con un tiempo de seguimiento <10 años sin recidiva o muerte confirmada. Debido a que periodo de seguimiento fue muy prolongado, resultó interesante estudiar el índice de fuga que se daba en diferentes estadios de seguimiento, lo cual reveló un índice de fuga muy bajo (Figura 47):

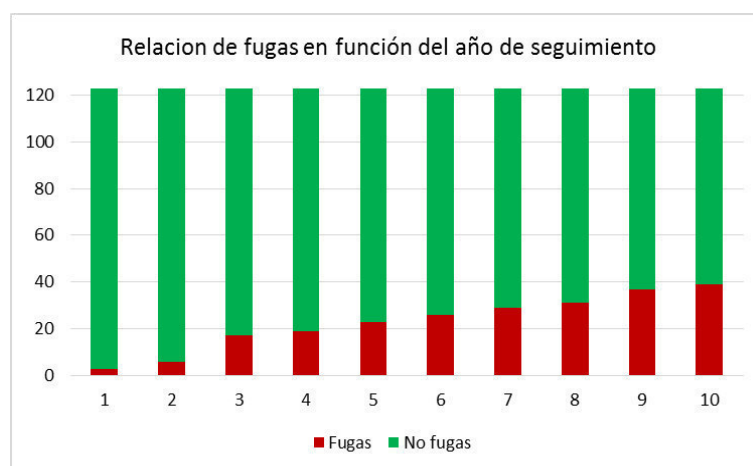


Figura 47. Relación del número de fugas, en función del año de seguimiento

- Fuga a los 2,5 años (8,94%, $n=11$)
- Fuga a los 5 años (18,7%, $n=23$)
- Fuga a los 7,5 años (24,4%, $n=30$)

Tal y como se observa en el gráfico, existe un seguimiento muy notable durante el periodo planteado en el diseño del estudio(10 años), lo cual aporta una buena potencia estadística respecto a los resultados de supervivencia.

- **Curación:** Definido como aquellos pacientes vivos sin recidiva diagnosticada, a los 5 y 10 años; o con recidiva diagnosticada, tratada y con seguimiento a los 5 y 10 años del tratamiento de la recidiva:
 - **Curación a 5 años:** 55 sin recidiva + 10 con recidiva tratada (52,84%, n=65)
 - **Curación a 10 años:** 42 sin recidiva + 6 con recidiva tratada (39,02%, n=48).
- **Muerte:** Fallecimiento confirmado durante el seguimiento, por causas oncológicas o no oncológicas (63,41%, n=78).
 - **Muerte a los 2 años** (9,75%, n=12)
 - **Muerte a los 5 años** (20,32%, n=25)
 - **Muerte a los 10 años** (26,82%, n=33)
- **Recidiva** (27,64%, n=35): Definido como la aparición de un carcinoma epidermoide durante el período de seguimiento, cercano al tumor original (recidiva local), en un ganglio linfático cervical (recidiva ganglionar) o una metástasis a distancia:
 - **Local** (19,51%, n=24): Tumor localizado en misma localización original (glotis) o en una sublocalización cercana, a menos de 2 cm del tumor primario.
 - **Ganglionar** (8,13%, n=10): Diagnóstico de metástasis regional, en alguna cadena linfática cervical, tipificada como carcinoma epidermoide.
 - **A distancia:** En un solo caso se confirmó mediante biología molecular la presencia de metástasis cerebral de carcinoma epidermoide, hecho muy infrecuente en el CECyC. Algunos pacientes presentaron durante su seguimiento carcinomas esofágicos, gástricos, vesicales y pulmonares, de extirpe epidermoide; pero sin embargo, nunca se realizó un estudio biológico molecular que dictaminara si eran metástasis a distancia o segundos tumores, por lo que no se han tenido en cuenta para el estudio.

La presencia de recidiva no presentó una relación significativa con el consumo de alcohol ($p=1,0$), consumo de tabaco ($p=0,801$), la edad al diagnóstico ($p=0,8$), el tamaño tumoral ($p=0,304$), la afectación ganglionar ($p=0,391$), el estadio ($p=0,173$) o la histología tumoral ($p=0,313$). De igual modo, la presencia de recidiva, no se vio influenciada por el tiempo de evolución de los síntomas al diagnóstico ($p=0,424$), presentando una media tiempo de evolución de los síntomas de 8,83 meses en los que no recidivaban frente a 6,9 meses en los que si recidivaban.

El tamaño tumoral y el lugar de la recidiva presentaron una relación estadísticamente significativa ($p=0,001$), evidenciando que la mayoría de los T1 y T2 no presentaban recidivas y si lo

hacían, la gran mayoría eran locales. Por el contrario, en los T3 y T4 si se presentaban recidivas eran mayormente ganglionares.

El estadio tumoral y el lugar de la recidiva presentaron una relación estadísticamente significativa ($p=0,000$) evidenciando que la mayoría de las recidivas locales, si se daban, eran en Estadio I (79,17%) y la mayoría de las recidivas ganglionares se daban en Estadio III (70%).

La presencia del VPH no supuso un factor determinante en el lugar de la recidiva ($p=0,873$) pero la presencia de p16 resultó ser un **factor determinante en la presencia de recidivas** ($p=0,002$) y en su **localización** ($p=0,002$), evidenciándose que las muestras p16 - presentaron mayor probabilidad de presentar recidivas (23,58%, $n=29$) que si se daban eran principalmente locales.

Esto se confirmó con el estudio de cohortes, en donde la **pertenencia a las cohortes con p16+** (1.2 y 2.2) resultó ser un **factor determinante en la aparición de recidivas y en su localización** ($p=0,009$). De este modo, las cohortes positivas para p16 fueron las que menor número de recidivas presentaron y, en concreto, la cohorte 2.2 (VPH + y p16 +) no presentó ninguna recidiva (Figura 48). Por ello, los datos reflejan que la proteína p16 supone un factor protector frente a la recidiva, que en conjunto con el VPH conforman una cohorte ausente de recidivas.

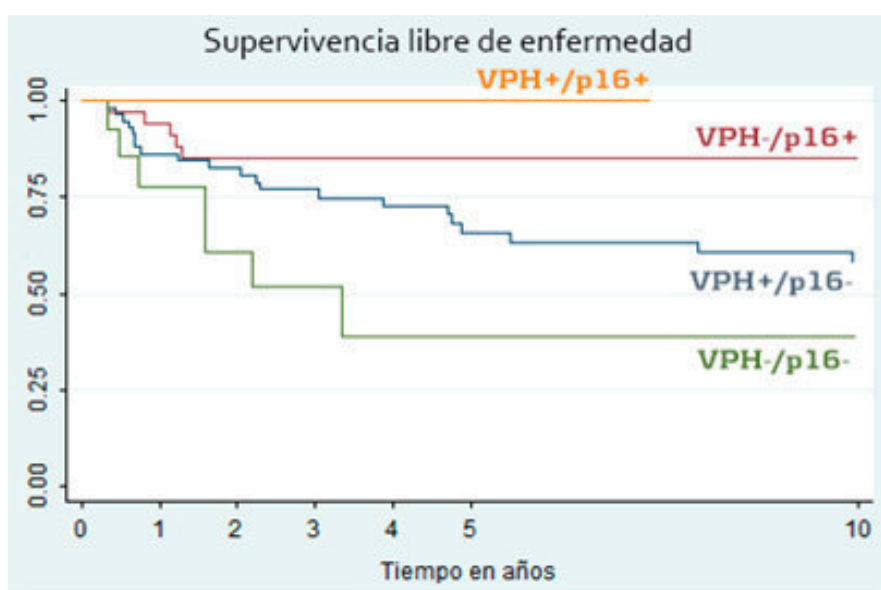


Figura 48. Curvas Kaplan-Meier de la supervivencia libre de enfermedad en función de la cohorte asignada por VPH y p16.

El lugar de recidiva supuso un factor determinante en la supervivencia global ($p=0,0309$) evidenciándose que las recidivas ganglionares presentaban una peor supervivencia que las locales; y que, de manera coherente, las muestras sin recidiva presentaban una mejor supervivencia global.

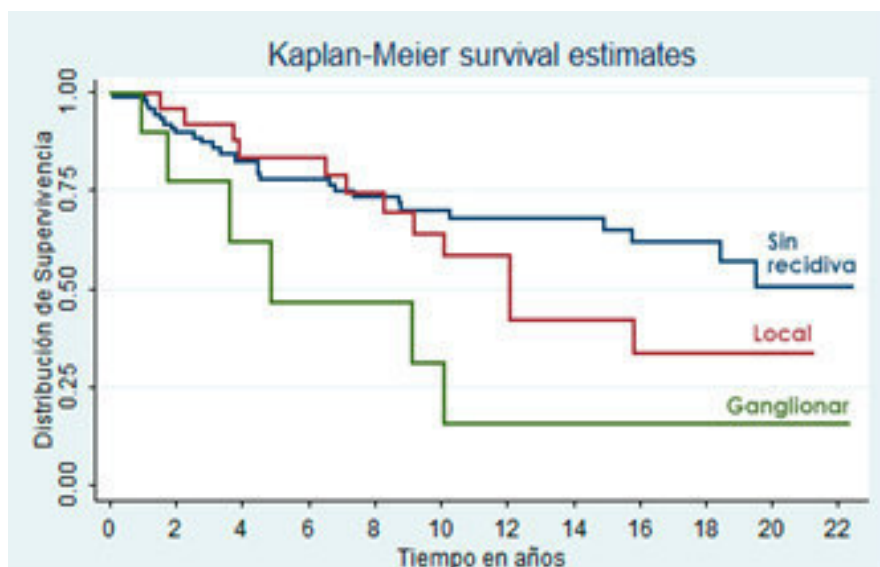


Figura 49. Curvas de Kaplan-Meier de supervivencia global respecto al lugar de recidiva

Tratamiento de la recidiva

Debido al diseño del estudio, el tratamiento primario fue únicamente la cirugía; una vez diagnosticada la recidiva, el tratamiento fue variable encontrando la laringectomía total de rescate, diversas cirugías laríngeas funcionales parciales, vaciamientos cervicales ganglionares, QT_i con laringectomía total o QT-RT.

Relacionados con la cirugía

Cirugía laríngea

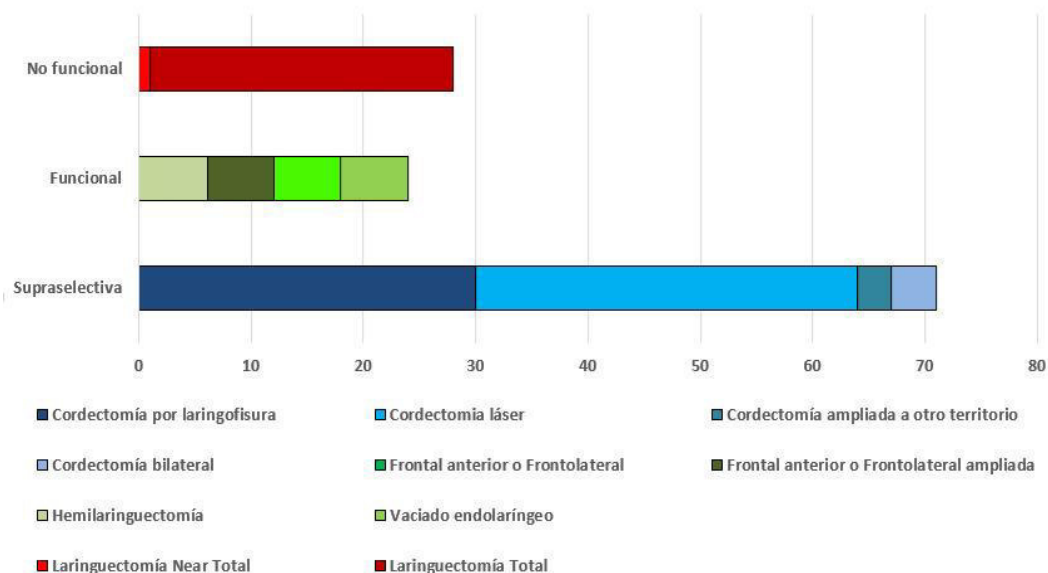


Figura 50. Relación de cirugías del tumor primario laríngeo, de origen glótico, realizadas

La cirugía más frecuente fue la supraselectiva (57,72%, n=71). En menor medida se realizaron cirugías no funcionales o mutilantes (22,76%, n=28) y funcionales (19,51%, n=24) (Figura 50).

Cirugía ganglionar

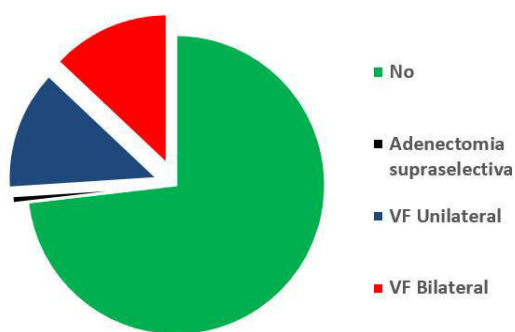


Figura 51. Relación de cirugías ganglionares realizadas

En la gran mayoría de los casos (73,17%, n=90) no se realizó cirugía ganglionar. En el resto de los casos se realizó una adenectomía supraselectiva (0,81% n=1); o un vaciamiento ganglionar cervical unilateral (13,01%, n=16) o bilateral (13,01%, n=16).

Estudio VPH

Presencia y serotipos

El estudio mediante PCR del ADN del VPH fue positivo para 28 muestras, de las 123 viables (22,76%).

Las muestras positivas mostraron la presencia de 11 serotipos diferentes (16, 31, 33, 35, 43, 53, 58, 61, 62, 66, 70). En 5 muestras se evidenció la coexistencia de dos serotipos, y en 1 muestra la coexistencia de 3 serotipos (Figura 52).

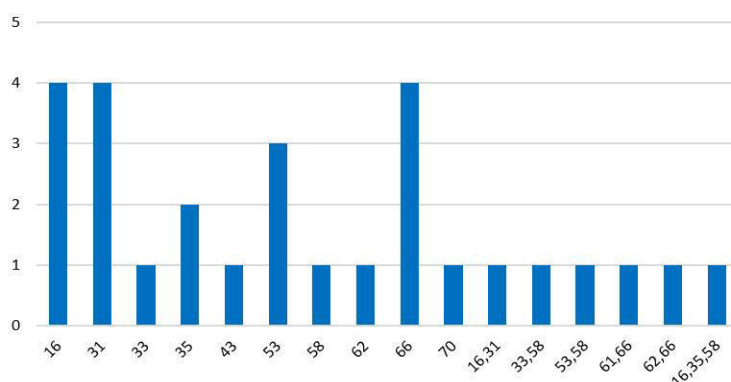


Figura 52. Distribución de serotipos VPH encontrados, incluyendo muestras con coexistencia de varios serotipos

Los serotipos más comunes fueron el VPH16 (21,43%, n=6) y el VPH66 (21,43%, n=6), seguidos por el VPH31 (17,86%, n=5) y el VPH53 (14,28%, n=4).

Oncogenicidad del VPH

La mayoría de las muestras presentan VPHs con riesgo oncogénico **alto** (57,1%, n=16) o **probablemente alto** (32,1%, n=9). Por otro lado, 3 de las muestras correspondieron a un serotipo de perfil oncogénico bajo (2,44%) (Figura 53).

Por tanto, la distribución de los serotipos VPH encontrados, según su oncogenicidad fue de **alto riesgo** oncogénico (16, 31, 33, 35 y 58), **probablemente alto** riesgo oncogénico (53 y 66), **bajo riesgo** oncogénico (43, 62 y 70) y **riesgo indeterminado** (61) (Figura 55)

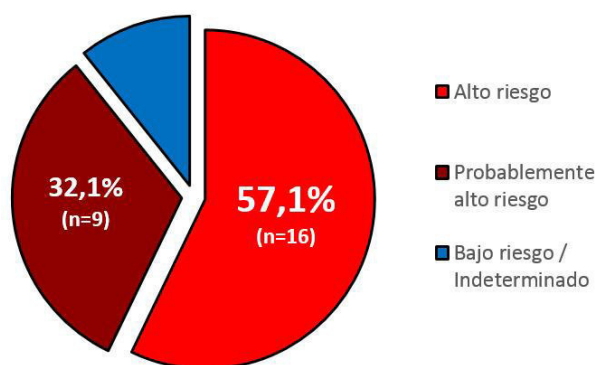


Figura 53. Distribución de serotipos VPH encontrados, en función de su oncogenicidad

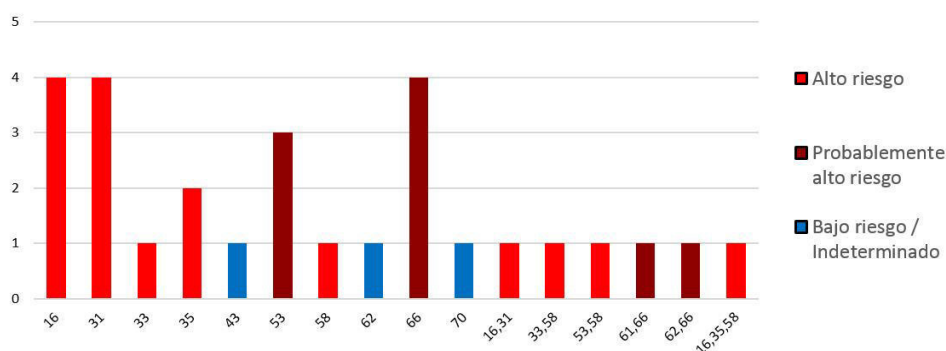


Figura 54. Distribución de serotipos VPH encontrados, incluyendo muestras con coexistencia de varios serotipos; en relación con la oncogenicidad asociada

Distribución del VPH por año de diagnóstico

Se estudió la presencia del VPH en las muestras, en función del año de diagnóstico (Figura 55), para comprobar la presencia del VPH a lo largo del tiempo y valorar una posible tendencia creciente, descrita por algunos autores(110, 271). Se realizaron dos estudios en función del año de diagnóstico:

- En base de la distribución por cuartiles de presencia del VPH: 1978-1992, 1993-1995, 1996-1997 y 1998-2005.
- En base a grupos homogéneos de años: 1978-1984, 1985-1991, 1992-1998 y 1999-2005.

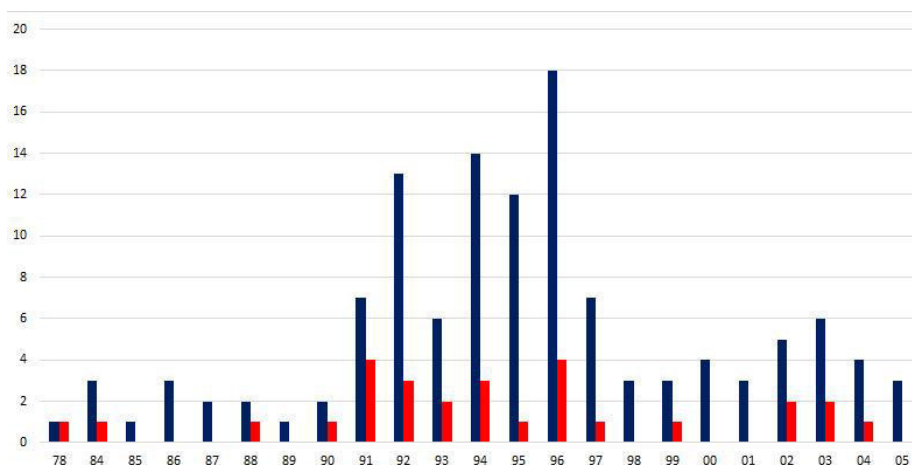


Figura 55. Distribución comparativa de las muestras en función de la positividad al VPH (azules VPH- y rojas VPH+), en función del año de diagnóstico

La relación del VPH con el tiempo fue homogénea y no se constató una tendencia alcista de la presencia del virus a lo largo de los años de diagnóstico, tanto en la distribución por cuartiles ($p=0,276$) como por grupos homogéneos de años ($p=0,1789$).

Estudio relacional VPH

A continuación se detalla el estudio relacional de la presencia del VPH respecto a las siguientes variables:

Edad al diagnóstico

La edad media al diagnóstico en la cohorte 1 (VPH -) fue de 62,66 años, frente a los 61,11 años de la cohorte 2 (VPH +), sin existir una relación significativa entre la edad y la presencia del VPH ($p=0,809$).

CNAE

No se encontró una relación significativa entre la profesión, clasificada por CNAE, y la presencia del VPH ($p=0,525$).

Síntoma de consulta y tiempo de evolución

No se encontró una relación significativa entre la presencia del VPH y el síntoma predominante referido ($p=0,139$) o el tiempo de evolución del mismo ($p=0,595$).

Consumo de tabaco o alcohol

Dentro de los pacientes fumadores, el grupo de VPH - fue mucho más numeroso (n=85, 76,57%), con una media de consumo de 30,12 cig/día. Sin embargo, no se evidenció una relación significativa entre el consumo de tabaco y la presencia del VPH (p=0,427).

El consumo de alcohol fue similar entre ambos grupos, siendo levemente superior en los VPH+ (2,36 vs. 2,13 unidades de alcohol/día), pero registrado en menor número de pacientes (22 vs. 70). Del mismo modo que con el tabaco, no se confirmó una relación significativa entre el consumo de alcohol y la presencia del VPH (p=0,563).

Origen tumoral

La relación entre la presencia del VPH respecto al origen de los CEL-G no resultó significativa (p=0,956).

Histología tumoral

El grado de diferenciación en la histología no mostró una relación estadísticamente significativa respecto a la presencia o no del VPH (p=0,481).

De las muestras VPH + un 50% (n=14) fueron descritas como Carcinoma Epidermoide bien diferenciado, un 14,29% (n=4) como Carcinoma Epidermoide moderadamente diferenciado, y un 10,71% (n=3) como Carcinoma Epidermoide pobremente diferenciado (n=3). En un 21,43% (n=6) las muestras no fueron descritas con grado de diferenciación (Figura 56).

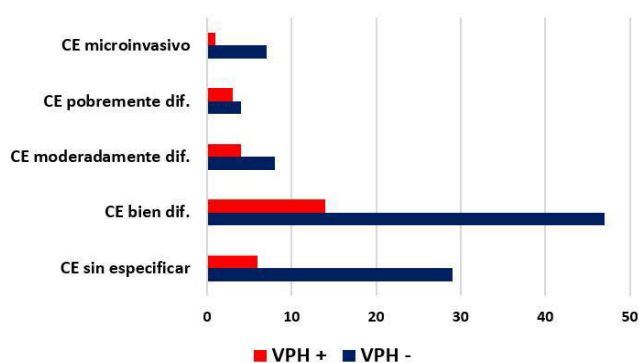


Figura 57. Relación del grado histológico tumoral en función de la positividad al VPH

Tamaño tumoral (T)

Se encontraron muestras positivas para VPH en 16 casos T1 (13,01%), 3 casos T2 (2,44%), 7 casos T3 (5,69%) y 2 casos T4 (1,63%) (Figura 57). Sin resultar estadísticamente significativa la relación entre el tamaño y la presencia del VPH ($p=0,304$).

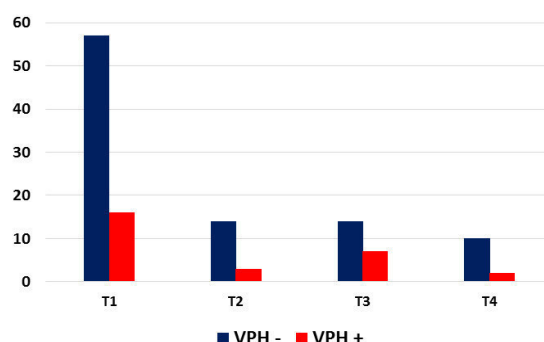


Figura 57. Relación del tamaño tumoral en función de la positividad al VPH

Afectación ganglionar (N)

La mayoría de los pacientes analizados no presentaron afectación ganglionar en el momento del diagnóstico, suponiendo un 77,97% de ellos ($n=92$) VPH - y un 22,03% ($n=26$) VPH +.

El resto de estadios de afectación ganglionar fueron puntuales: en los VPH - 1 caso de N2A y 2 casos de N2C, mientras que en los VPH + 1 caso de N1 y 1 caso de N2B. La relación entre la presencia de VPH y la afectación ganglionar no resultó estadísticamente significativa ($p=0,103$).

Estadio tumoral

La distribución de los VPH + según el estadio tumoral, fue similar y no estadísticamente significativo ($p=0,508$). De entre ellos un 57,14% era un Estadio I ($n=16$), un 7,14% un Estadio II ($n=2$), un 25% era un Estadio III ($n=7$) y un 10,71% un Estadio IV ($n=3$).

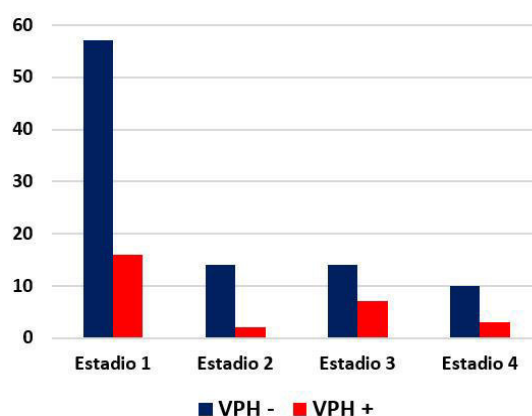


Figura 58. Relación del estadio tumoral en función de la positividad al VPH

Recidiva

De manera coherente con la muestra total, el mayoría de las muestras positivas para VPH no presentaron recidiva alguna (71,43%, n=20). Por tanto, la positividad o negatividad al VPH no resultó determinante en la aparición de recidivas ($p=0,988$) o en el lugar de aparición de las mismas ($p=0,873$). De igual modo, el tiempo hasta que se diagnosticaba la recidiva no fue estadísticamente significativo ($p=0,323$), siendo más precoz en los VPH+ (1775 días) frente a los VPH- (2242,29 días).

Estudio p16

Presencia

El estudio inmunohistoquímico del p16 reveló la presencia del mismo en el 39,02% (n=48). Por el contrario fue negativo en el 60,98% (n=75) (Figura 59).

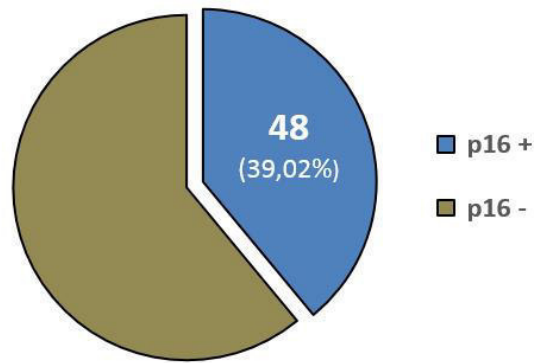


Figura 59. Relación de muestras positivas para p16

Distribución del p16 por año de diagnóstico

La distribución del p16 fue homogénea a lo largo del tiempo, sin constatar una tendencia o variación estadísticamente significativa en la distribución por cuartiles ($p=0,597$) o por grupos igualitarios de tiempo ($p=0,086$).

Estudio relacional p16

A continuación se detalla el estudio relacional de la presencia de la proteína p16 respecto a las siguientes variables:

Edad al diagnóstico

La edad media al diagnóstico fue levemente más precoz en los pacientes p16+ (60,73 años) frente a los p16- (63,32 años), sin ser estadísticamente significativa dicha diferencia ($p=0,313$).

CNAE

No se encontró una relación significativa entre la profesión, clasificada por CNAE, y la presencia del p16 ($p=0,789$).

Síntoma de consulta y tiempo de evolución

No se encontró una relación significativa entre la presencia del p16 y el síntoma predominante referido ($p=0,192$) o el tiempo de evolución de dicho síntoma ($p=0,659$).

Consumo de tabaco o alcohol

El grupo de los p16 - contenía más fumadores, pero con menor cantidad (media de 28,93 cig/día) mientras que los p16 eran menos, pero más fumadores (media de 30,49 cig/día). Sin embargo, no se evidenció una relación significativa entre la presencia de p16 y el consumo de tabaco ($p=0,782$).

El consumo de alcohol fue muy similar en ambos grupos. Del mismo modo que con el tabaco, no se confirmó una relación significativa entre el consumo de alcohol y la positividad al p16 ($p=0,789$).

Origen tumoral

No se evidenció una relación significativa entre la presencia del p16 y el origen tumoral ($p=0,662$).

Histología tumoral

No existe una relación significativa entre la positividad o negatividad a la proteína p16, respecto al subtipo histológico de Carcinoma Epidermoide analizado ($p=0,928$)

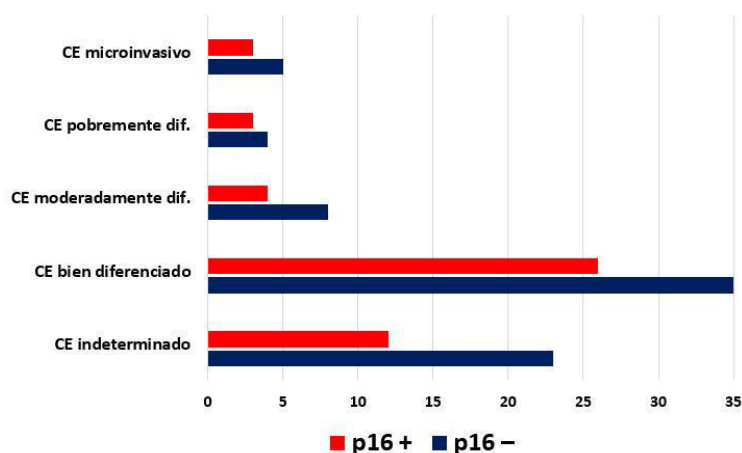


Figura 60. Relación de positividad al p16 en función de la histología tumoral.

Tamaño tumoral (T)

La presencia de p16 no fue estadísticamente significativa en ninguno de los tamaños ($p=0,142$) confirmándose una mayor presencia en las muestras T1 (23,57%, $n=29$) que eran las más frecuentes (60,27%) (Figura 61).

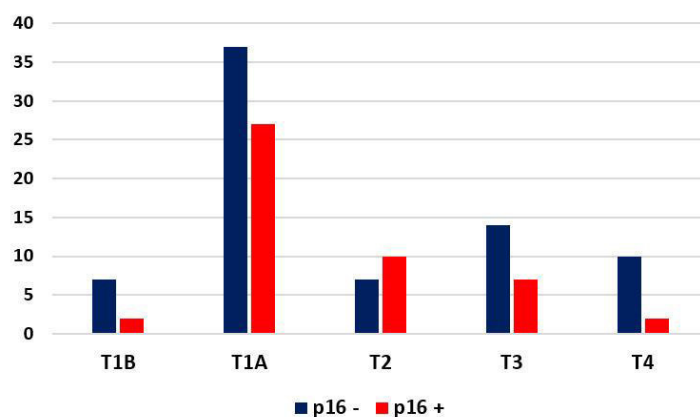


Figura 61. Relación del tamaño tumoral en función de la positividad al p16

Afectación ganglionar (N)

La afectación ganglionar se estudió de manera global (afectación SI o NO), observando que ninguna muestra p16 tuvo afectación ganglionar ($p=0,08$). Esta ausencia de significación puede verse influenciado por el número mínimo de muestras con afectación ganglionar (4,06%, $n=5$).

Al estratificar los datos en función del grado de afectación ganglionar (N0, N1, N2A, N2B, N2C) la significación estadística es todavía menor ($p=0,892$), por lo que se infiere que la p16 no tiene influencia en la afectación ganglionar.

Estadio tumoral

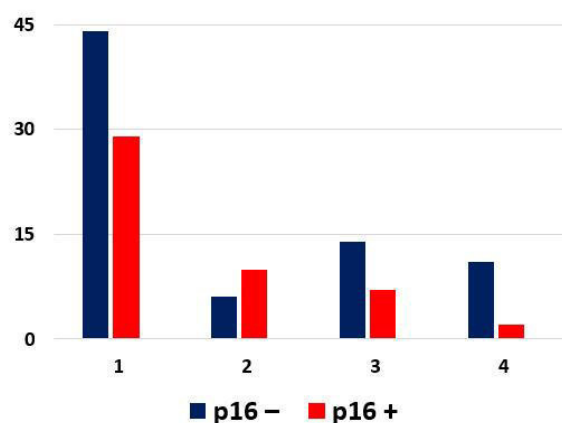


Figura 62. Relación del estadio tumoral en función de la positividad al p16

La estadio tumoral al diagnóstico no fue un hecho determinado por la presencia de la proteína p16 ($p=0,077$), encontrándose la mayoría de las muestras p16+ el estadio mayoritario, el estadio I. En este estadio I, las muestras p16 fueron positivas en un 39,73% (Figura 62).

Recidiva y lugar de aparición

La **positividad a la p16** resultó ser un **factor determinante en la presencia de recidivas ($p=0,002$) y su localización ($p=0,002$)**. Las muestras que no presentaron recidivas presentaron una distribución casi similar de p16 - ($n=43$) frente a p16 + ($n=46$). Sin embargo, **las muestras p16 - presentaron mayor probabilidad de presentar recidivas, que eran principalmente locales y, muy raramente, ganglionares. De hecho, el 90% de las recidivas ganglionares se dieron en muestras p16 -**.

La recidiva de metástasis cerebral fue negativa a p16.

Estudio de cohortes

Descripción de cohortes y relación VPH-p16

La relación del p16 con el VPH, en general, resultó no significativa ($p=0,176$).

Cuando se estudió la relación entre el p16 y cada uno serotipos de VPH, sin agrupar; la dispersión de datos era excesiva para poder extraer datos significativos. Por ello, se agruparon los serotipos en base a su oncogenicidad, sin encontrar tampoco una relación significativa ($p=0,067$), observándose que la totalidad de los serotipos de bajo riesgo ($n=3$) presentaban una p16+; mientras que en el caso de los VPH-AR la presencia del p16 era negativa en el 56% y positiva en el 44% de las muestras.

En base a la presencia del VPH y/o de la proteína p16 se establecieron cuadro cohortes (Figura 63):

- **Cohorte 1.1:** VPH negativo, p16 negativo: 49,59% ($n=61$)
- **Cohorte 1.2:** VPH negativo, p16 positivo: 27,64% ($n=34$)
- **Cohorte 2.1:** VPH positivo, p16 negativo: 11,38% ($n=14$)
- **Cohorte 2.2:** VPH positivo, p16 positivo: 11,38% ($n=14$)

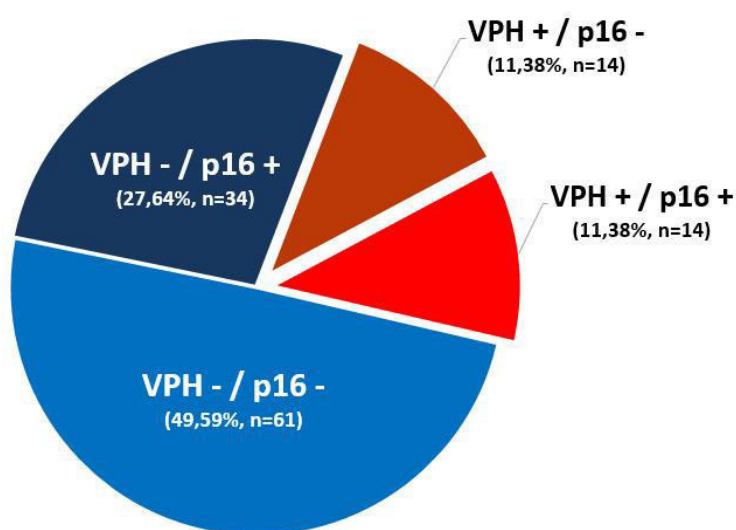


Figura 63. Relación de cohortes establecidas, en función del resultado al VPH y p16

Distribución en el tiempo

No se constató una variación significativa en la presencia de determinada cohorte a lo largo del tiempo tanto en la distribución temporal por cuartiles ($p=0,654$) como grupos igualitarios de tiempo ($p=0,794$).

Estudio relacional cohortes

A continuación se detalla el estudio relacional de las cohortes respecto a las siguientes variables:

Edad al diagnóstico

La cohorte que mayor edad presentó al diagnóstico fue la Cohorte 1.1 (VPH -, p16 -) con una media de 63,82 años (frente a 62,31 años de la totalidad de la muestra); mientras que la que menor edad presentó fue la Cohorte 1.2 (VPH -, p16 +) con una media de 60,59 años. Las cohortes VPH + (2.1 y 2.2) presentaron unas edades medias de diagnóstico muy similares, 61,15 años y 61,07 años, respectivamente. Sin embargo, la edad al diagnóstico no supuso un factor determinante en la pertenencia a una cohorte ($p=0,611$)

Consumo de tabaco o alcohol

No se evidenció una relación significativa entre la cohorte asignada y el consumo de tabaco ($p=0,772$) o alcohol ($p=0,84$).

Síntoma de consulta y tiempo de evolución

No se evidenció una relación significativa entre la cohorte asignada y el síntoma principal al diagnóstico ($p=0,236$) o el tiempo de evolución de dicho síntoma ($p=0,869$).

Datos tumorales

No se evidenció una relación significativa entre el origen ($p=0,741$) o la histología tumoral con la cohorte asignada ($p=0,692$).

Tamaño tumoral (T)

Se encontró una relación significativa entre la cohorte asignada y el tamaño tumoral ($p=0,012$), destacando que notablemente el mayor número de T3 (57,14% del total de T3) y T4 (75% del total de T4) correspondían a la cohorte negativa para p16 y VPH (1.1)

Afectación ganglionar (N)

No se evidenció una relación significativa entre la cohorte asignada y la afectación ganglionar al diagnóstico ($p=0,092$).

Estadio tumoral

De manera coherente con el tamaño tumoral, **se encontró una relación significativa entre la cohorte asignada y el estadio tumoral ($p=0,02$)**, destacando que notablemente el mayor número de pacientes clasificados como Estadio III (57,14% del total de Estadios III) y Estadio IV (69,32% del total de Estadios IV) correspondían a la cohorte negativa para p16 y VPH (1.1). Por otro lado, la mayoría de pacientes de las cohortes 2.1 (57,14%) y 2.2 (57,14%) presentaron un Estadio I.

Recidiva y lugar de aparición

La pertenencia a una determinada cohorte resultó ser un factor determinante en la aparición de recidivas ($p=0,003$) y en la localización de la recidiva ($p=0,009$). De ello se extraen conclusiones respecto a la predisposición a la recidiva como:

- La cohorte 2.2 (VPH + y p16 +) no presentó ninguna recidiva.
- Las cohortes p16 + (cohortes 1.2 y 2.2) fueron las que menor número de recidivas presentaron:
 - 5 recidivas (4 locales y 1 ganglionar) para la cohorte 1.2 (VPH- y p16+), es decir solamente el 14,7% de las muestras de la cohorte presentaron recidivas.
 - 0 recidivas para la cohorte 2.2 (VPH+ y p16 +)

Por ello, los datos reflejan que la proteína p16 supone un factor protector frente a la recidiva (Fig. 64), que en conjunto con el VPH conforman una cohorte ausente de recidivas; y por ello tiene influencia final en la supervivencia libre de enfermedad.

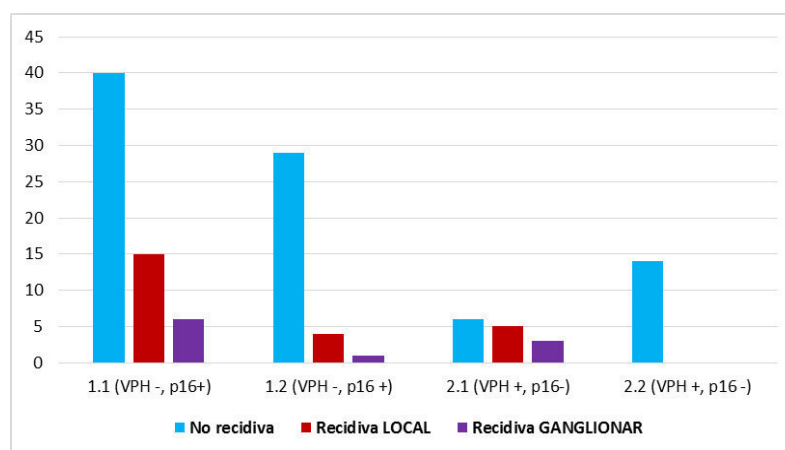


Figura 64. Relación del lugar de la recidiva, en función de la cohortes asignada (1.1 VPH- y p16-, 1.2 VPH- y p16+, 2.1 VPH+ y p16-; y 2.2 VPH+ y p16+)

Supervivencia

Supervivencia global (SvG) cruda

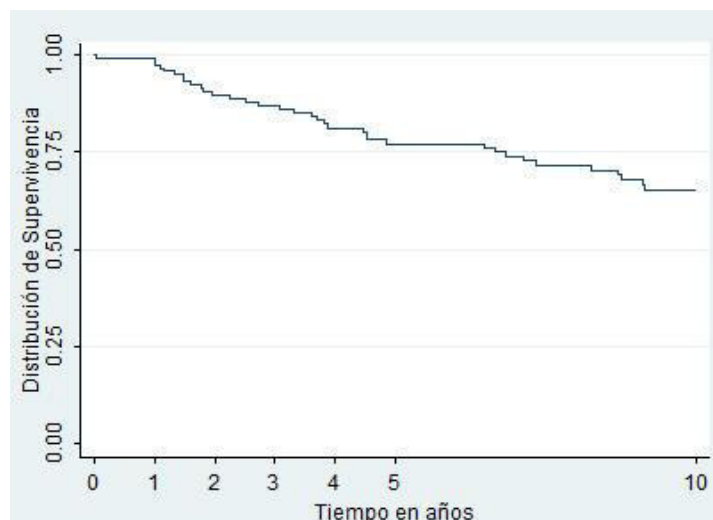


Figura 65. Curva de Kaplan-Meier de supervivencia global cruda del CEL-G

Tal y como puede observarse en la Figura 65, en nuestra serie, la SvG del CEL-G alcanzó:

- **A los 3 años:** $87,13 \pm 3,11\%$ ($n=92$) [IC 79,54 – 92,04]
- **A los 5 años:** $77,20 \pm 4,04\%$ ($n=76$) [IC 68,06 – 84,02]
- **A los 10 años:** $65,44 \pm 4,85\%$ ($n=50$) [IC 55,02 – 74,01]

A continuación se detalla el estudio relacional de la supervivencia libre de enfermedad respecto a las siguientes variables:

Edad y al año de diagnóstico

La edad del paciente al diagnóstico ($p=0,0229$) supuso un factor determinante en la SvG presentando un *hazard ratio* de 1,037605, es decir, que por cada año de edad aumentaba un 3,76% la posibilidad de muerte.

Sin embargo, el año de diagnóstico, clasificado por cuartiles ($p=0,7943$) o por grupos igualitarios de tiempo ($p=0,9761$) no resultó ser un factor determinante en la SvG.

Síntoma de consulta y tiempo de evolución

La relación entre el síntoma de consulta y la SvG fue significativa ($p=0,0441$), sin poderse establecerse una razón de riesgo significativa para cada uno de los síntomas ($p=0,1283$). De esta manera

se evidenció que los pacientes con disnea como primer síntoma ($n=3$), presentaron las muertes más precoces, mientras que el único que refirió odinofagia, no falleció durante el seguimiento. La disfonía comparte la significación estadística de ser el síntoma más frecuente en tumores glóticos y, consecuentemente, el que más eventos de muerte asocia ($n=30$).

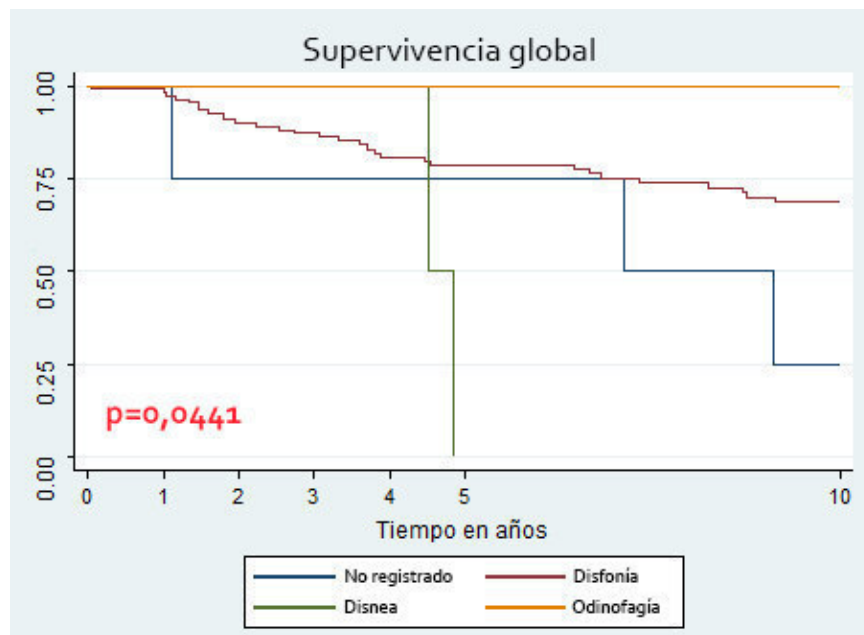


Figura 66. Curvas de Kaplan-Meier de supervivencia global respecto al síntoma primario referido por el paciente al diagnóstico

El tiempo de evolución del síntoma, no supuso un factor determinante en la SvG ($p=0,977$).

CNAE

La pertenencia a un grupo profesional, clasificado en la CNAE, no supuso un factor determinante para la supervivencia global ($p=0,2971$). La dispersión de datos y la agrupación de profesiones, dentro de cada uno de los subgrupos CNAE, dificulta ampliamente la extracción de datos específicos.

Consumo de tabaco o alcohol

El consumo de tabaco resultó ser un factor determinante en la SvG ($p=0,008$) con un *hazard ratio* de 1,028606. Es decir, por cada cigarrillo que el paciente reconocía fumar al día, el riesgo de fallecer incrementaba un 2,86%.

Por el contrario, el consumo de alcohol no supuso un factor determinante en el SvG ($p=0,2049$)

Histología y origen tumoral

No se encontró una diferencia significativa ($p=0,8009$) en la SvG a los 3, 5 y 10 años entre los diferentes subtipos histológicos de carcinoma epidermoide (bien diferenciado, moderadamente diferenciado, pobremente diferenciado o microinvasivo). De igual modo no se encontró una relación significativa con el origen del tumor ($p=0,3134$)

Tamaño tumoral

No se encontró una diferencia significativa ($p=0,572$) en la SvG a los 3, 5 y 10 años en función del tamaño tumoral encontrado.

Afectación ganglionar

En el estudio estadístico la afectación ganglionar o la presencia de metástasis regionales, estratificada según la N (0, 1, 2A, 2B, 2C), reveló una **relación significativa con la SvG ($p=0,0063$)**.

Este dato parece poco relevante, dado que refleja un mayor índice de muerte en el grupo N0, que es el grupo de afectación ganglionar mayoritario (95,93%). Por tanto, tienen peor SvG los N0 porque son mayoritarios, no porque sea real que los N0 tienen peor supervivencia que los N+.

De hecho, si se estratifican los datos en afectación ganglionar sí o no, la relación de supervivencia es no significativa ($p=0,78$); es decir, la afectación ganglionar no supuso un dato relevante en la SvG.

Estadio tumoral

No se encontró una diferencia estadísticamente significativa ($p=0,318$) en la SvG a los 3, 5 y 10 años en función del estadio tumoral.

Lugar de la recidiva

La recidiva fue constatada en 35 pacientes (24 recidivas locales, 10 ganglionares y 1 metástasis a distancia), suponiendo el 27,64% de los paciente estudiados (Figura 67).

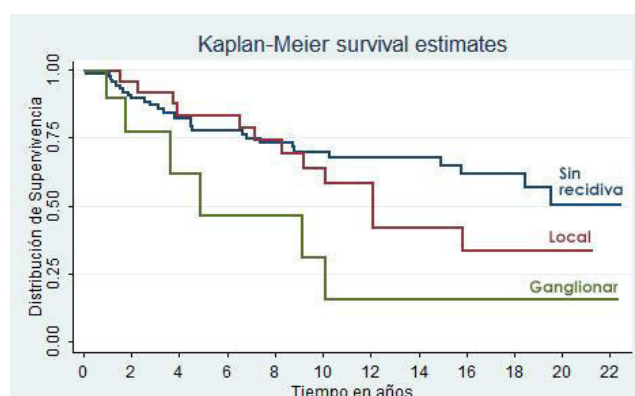


Figura 67. Curvas de Kaplan-Meier de supervivencia global respecto al lugar de recidiva

El estudio de supervivencia reveló que **el lugar de recidiva supuso un factor determinante en la SvG ($p=0,0309$)** encontrando que, de manera coherente, los sujetos con mejor SvG eran los que no presentaron recidiva alguna; mientras que los que presentaron alguna recidiva ganglionar, presentaron significativamente la peor SvG.

Supervivencia libre de enfermedad (SvLE) cruda

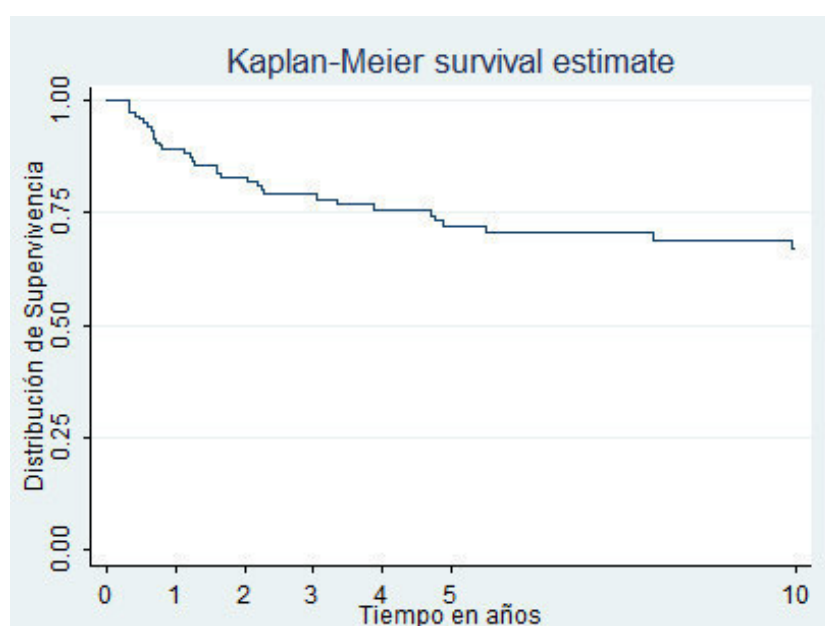


Figura 68. Curva de Kaplan-Meier de supervivencia libre de enfermedad en el CEL-G

Tal y como puede observarse en la Figura 70, en nuestra serie, la SvLE global del CEL-G alcanzó:

- **A los 3 años:** $79,13 \pm 3,81\%$ ($n=75$) [IC 70,45 – 85,52]
- **A los 5 años:** $71,93 \pm 4,46\%$ ($n=76$) [IC 62,10 – 79,63]
- **A los 10 años:** $67,28 \pm 4,93\%$ ($n=50$) [IC 56,58 – 75,89]

A continuación se detalla el estudio relacional de la supervivencia libre de enfermedad respecto a las siguientes variables:

Edad y al año de diagnóstico

La edad del paciente ($p=0,8404$) y el año de diagnóstico, clasificado por cuartiles ($p=0,1099$) o por grupos igualitarios de tiempo ($p=0,2708$) no resultaron factores determinantes en la SvLE.

Síntoma de consulta y tiempo de evolución

La relación entre el síntoma de consulta y la SvLE no resultó significativa ($p=0,3271$) ni tampoco el tiempo de evolución del síntoma ($p=0,4207$).

CNAE

La pertenencia a un grupo profesional, clasificado en la CNAE, no supuso un factor determinante para la supervivencia global ($0,9578$).

Consumo de tabaco o alcohol

El consumo de tabaco no resultó ser un factor determinante en la SvLE ($p=0,438$), al contrario de lo ocurrido en la SvG. De igual modo, no existe una relación significativa entre el grado de consumo de alcohol y la SvLE ($p=0,5286$).

Histología y origen tumoral

No se halló una relación estadísticamente significativa entre la SvLE y la histología ($p=0,3427$) o el origen tumoral ($p=0,9016$).

Tamaño tumoral (T)

Al contrario de lo ocurrido en la supervivencia global, el tamaño tumoral al diagnóstico no supuso un factor determinante en la SvLE ($p=0,129$).

Afectación ganglionar (N)

La mayoría de recidivas se dieron en pacientes con N0, sólo reportándose una recidiva en un paciente N1, por lo que el estudio de la SvLE no revela muchos datos, siendo estadísticamente no significativo ($p=0,3455$). Es decir, la afectación ganglionar no supuso un factor determinante en la SvLE.

Estadio tumoral

A diferencia de lo ocurrido en la supervivencia global y, de manera coherente con los resultados no significativos en la relación del tamaño con el SvLE; no se halló una relación estadísticamente significativa ($p=0,0745$) entre el estadio tumoral al diagnóstico y la SvLE.

Lugar de la recidiva

La recidiva pudo ser local (19,51%, n=24) o ganglionar (8,13%, n=10), además de un caso muy infrecuente de metástasis a distancia cerebral, que no se tuvo en cuenta para el análisis global, dado lo excepcional del caso.

El estudio estadístico reveló que **el lugar de la recidiva influía en la SvLE ($p=0,0000$)**. Tal y como se evidencia en la Figura 69, se revela que, de manera significativa, las recidivas ganglionares se presentaban antes que las recidivas locales.

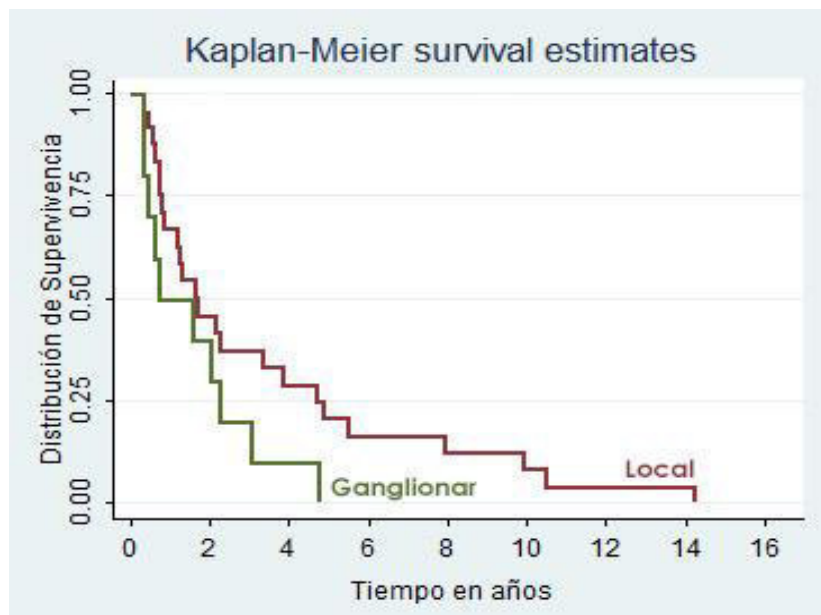


Figura 69. Curvas de Kaplan-Meier de supervivencia libre de enfermedad respecto al lugar de recidiva

Supervivencia cohortes globales

SvG y SvLE, en VPH

Se establecieron dos cohortes globales: VPH + y VPH -.

No se encontró una diferencia significativa ($p=0,5598$) en la SvG entre los grupos VPH - y VPH + (Figura 70). Tampoco se encontraron diferencias significativas respecto al grado de oncogenicidad ($p=0,4192$), serotipos encontrados ($p=0,0749$) o histología encontrada ($p=0,3204$).

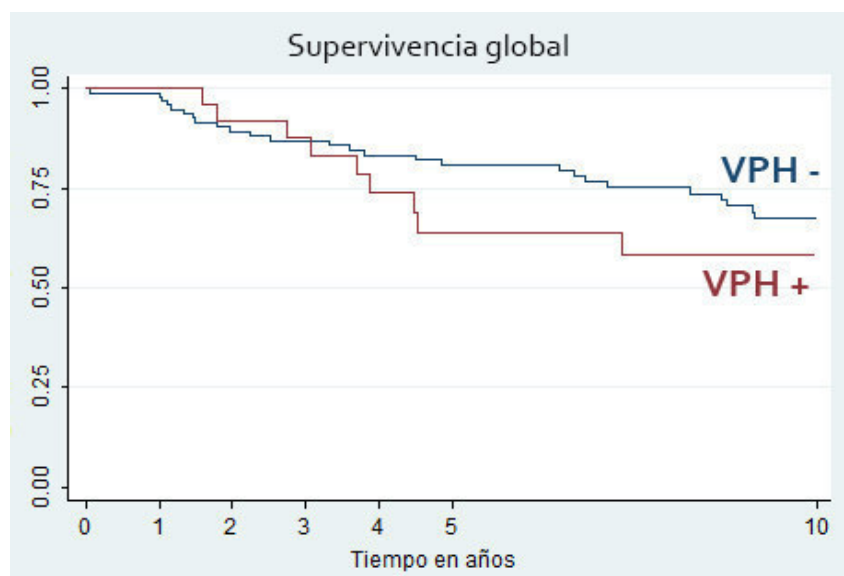


Figura 70. Curvas de Kaplan-Meier de supervivencia global respecto a la positividad o no al VPH

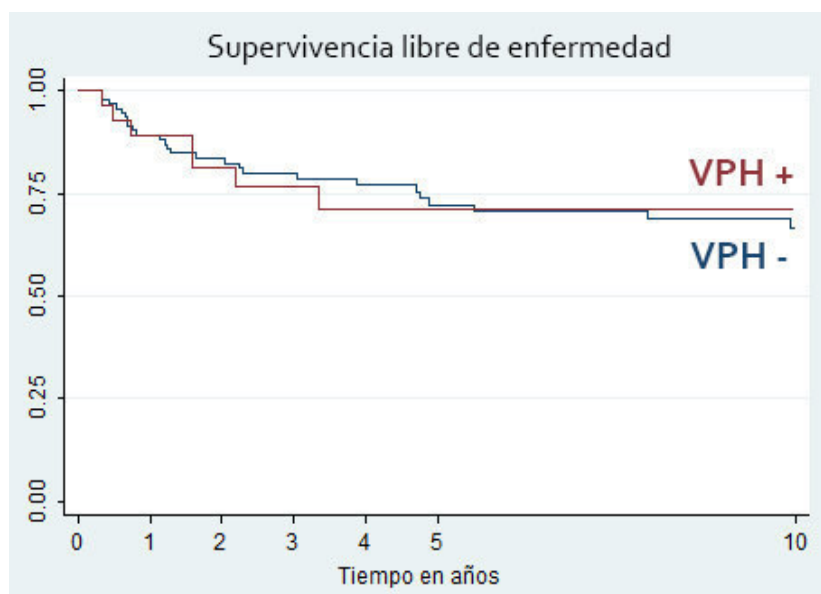


Figura 71. Curvas de Kaplan-Meier de supervivencia libre de enfermedad respecto a la positividad o no al VPH

De igual modo, la presencia del VPH no resultó ser un factor significativo ($p=0,7714$) en la SvLE. Tampoco se encontraron diferencias significativas respecto al grado de oncogenicidad ($p=0,2807$) o histología encontrada ($p=0,1771$). Es decir, el VPH no influía en la formación de un subtipo histológico concreto.

Sin embargo, cuando se estudiaban los serotipos de VPH encontrados, de manera independiente, se halló una relación significativa **entre el serotipo descrito y la SvLE ($p=0,0000$)**. Sin embargo, el número escaso de muestras por serotipo encontrados y la consecuente dispersión de datos, impide la extracción de conclusiones a este respecto.

SvG y SvLE, en p16

Se establecieron dos cohortes globales: p16 + y p16 -.

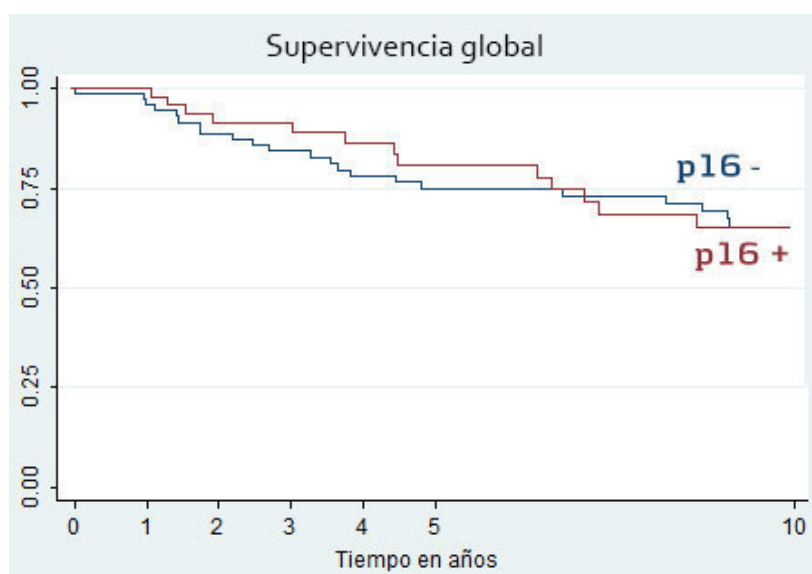


Figura 72. Curvas de Kaplan-Meier de supervivencia global respecto a la positividad o no al p16

No se encontró una diferencia significativa ($p=0,7750$) en la SvG a los 3, 5 y 10 años entre los grupos p16 + y - (Figura 73). Tampoco se encontraron diferencias significativas respecto a la histología encontrada ($p=0,9427$).

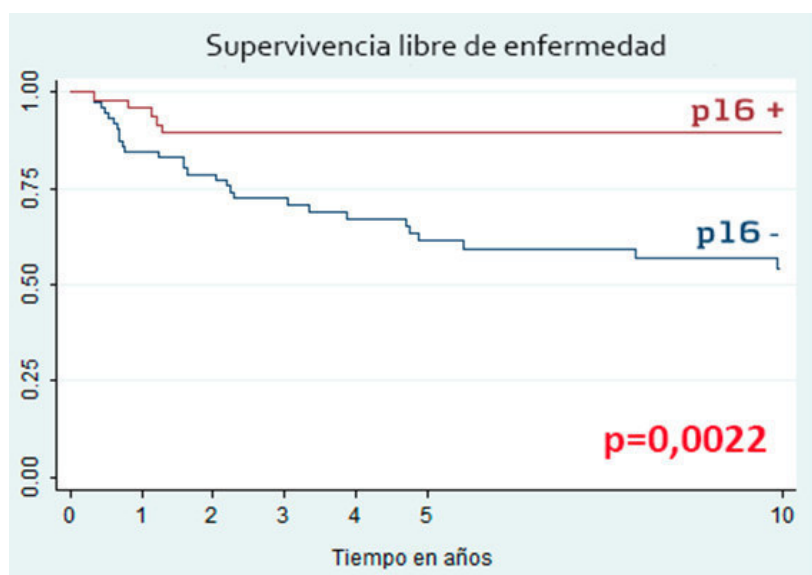


Figura 73. Curvas de Kaplan-Meier de supervivencia global respecto a la positividad o no al VPH

Sin embargo, la presencia del p16 sí resultó ser un factor determinante en la SvLE ($p=0,0022$) (Figura 75), con un *hazard ratio* de 0,2432 ($p=0,0008$), es decir un 76% menos de probabilidad de

muerte por año en los p16 +. Se evidenció una mejor supervivencia libre de enfermedad de las cohortes p16 +.

Por el contrario, no se evidenció una variación en la supervivencia libre de enfermedad en función de la positividad o negatividad al p16, respecto a cada una de las histologías ($p=0,114$)

Supervivencia cohortes específicas

SvG en cohortes

La cohorte que peor supervivencia global presentó a largo plazo fue la 2.2 (VPH+ y p16+) y la que mejor fue la 2.1 (VPH+ p16-). Sin embargo, estas diferencias no resultaron significativas ($p=0,9202$) (Figura 74).

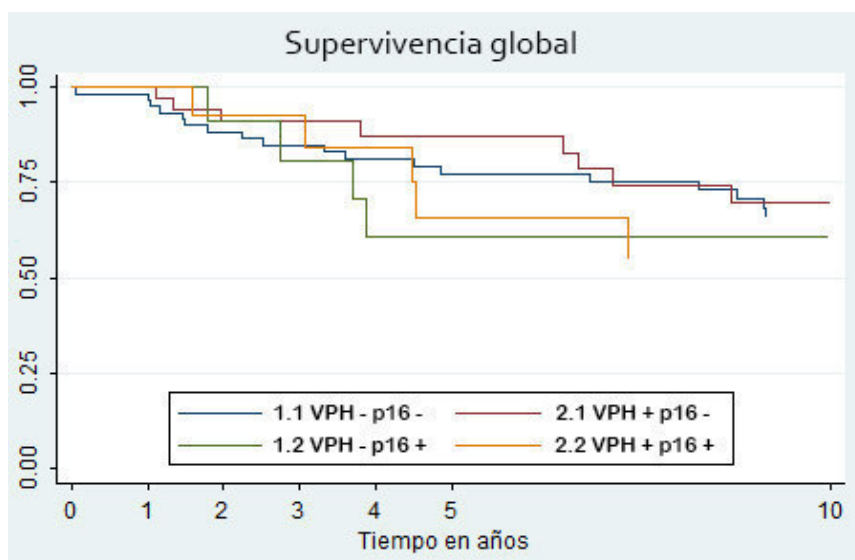


Figura 74. Curvas de Kaplan-Meier de supervivencia global respecto a la cohorte asignada, en función de la positividad VPH y/o p16.

SvLE en cohortes

Se encontró una **diferencia significativa entre las diferentes cohortes y la SvLE ($p=0,0021$)**. De manera coherente con los resultados en relación con la presencia de la proteína p16, en los que la cohorte global con p16+ presentaba una mayor supervivencia libre de enfermedad. Al contrario, las cohortes con negatividad a la proteína p16 presentaban una significativa menor supervivencia libre de enfermedad que las p16 +.

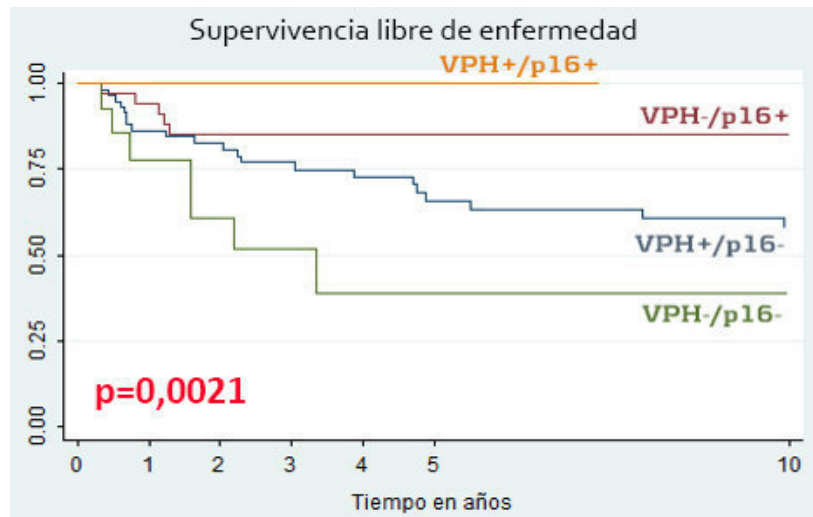


Figura 75. Curvas de Kaplan-Meier de supervivencia libre de enfermedad respecto a la cohorte asignada, en función de la positividad VPH y/o p16.

Paradójicamente con el resultado reflejado en la SvG, que era no significativo; **la cohorte que mayor SvLE presentó fue la 2.2, correspondiente a muestras VPH + y p16 + (Figura 75)**. Es decir, la correlación entre VPH+ y p16 + asocia cifras mayores de SvLE.

Desglosando los datos afectados por la positividad al p16, en **la cohorte 2.2 (VPH + y p16 +)** no se presentó ningún evento a lo largo del seguimiento, es decir, **presentó una SvLE del 100%**.

En la cohorte 1.2 (VPH - y p16 +) los eventos ocurrieron siempre antes del segundo año de seguimiento, manteniendo la misma supervivencia a partir de entonces; es decir, **a partir del segundo año de seguimiento, la cohorte 1.2 mantuvo la misma SvLE**.

TABLAS DE DATOS: *VPH y p16*

Característica	Global	VPH -	VPH +	p	p16 -	p16 +	p	SV. GLOBAL	SV. LIBRE ENFERMEDAD
Edad: \bar{X} años (rango)	62,31 (33-86)	62,66 (39-86)	61,11 (33-83)	0,809	63,32 (39-86)	60,73 (33-83)	0,313	0,062	0,999
Año de diagnóstico									
<i>Por cuartiles</i>				0,276			0,597	0,7943	0,1099
1978-1992	28,46% (35)	19,51% (24)	8,94% (11)		16,26% (20)	12,2% (15)			
1993-1995	26,02% (32)	21,14% (26)	4,88% (6)		15,45% (19)	10,57% (13)			
1996-1997	20,33% (25)	16,26% (20)	4,07% (5)		13,82% (17)	6,5% (8)			
1997-2005	25,2% (31)	20,33% (25)	4,88% (6)		15,45% (19)	9,76% (12)			
<i>Por grupos de tiempo</i>				0,18			0,086	0,9761	0,2708
1978-1984	3,25% (4)	1,63% (2)	1,63% (2)		3,25% (4)	0% (0)			
1985-1991	14,63% (18)	9,76% (12)	4,88% (6)		8,94% (11)	5,69% (7)			
1992-1998	59,35% (73)	47,97% (59)	11,38% (14)		21,14% (26)	38,21% (47)			
1999-2005	22,76% (28)	17,89% (22)	4,88% (6)		8,94% (11)	13,82% (17)			
Tabaco: $\bar{X} \pm DE$ cigarros/día (n, %)	29,5 \pm 15,81 (111, 89,43%)	30,12 \pm 16,48 (85, 69,1%)	27,5 \pm 13,51 (26, 21,14%)	0,427	28,93 \pm 15,55 (70, 56,91%)	30,49 \pm 16,39 (41, 33,33%)	0,782	0,008	0,438
Alcohol: $\bar{X} \pm DE$ UA/día (n, %)	2,64 \pm 0,87 (76, 61,78%)	2,13 \pm 1,32 (70, 56,91%)	2,36 \pm 1,18 (22, 17,89%)	0,563	2,22 \pm 1,23 (58, 47,15%)	2,12 \pm 1,39 (34, 27,64%)	0,789	0,205	0,529
Síntoma principal								0,0441	0,3271
Disfonía	115 (93,5%)	88 (71,54%)	27 (21,95%)	0,139	70 (56,91%)	45 (36,59%)	0,192		
Disnea	3 (2,44%)	3 (2,44%)	0 (0%)		3 (2,44%)	0 (0%)			
Odinofagia	1 (0,81%)	0 (0%)	1 (0,81%)		1 (0,81%)	0 (0%)			

Característica	Global	VPH -	VPH +	p	p16 -	p16 +	p	SV. GLOBAL	SV. LIBRE ENFERMEDAD
Histología								0,8	0,4032
CE sin especificar	28,46% (35)	23,58% (29)	4,88% (6)	0,481	18,7% (23)	9,76% (12)	0,928		
CE bien diferenciado	49,59% (61)	38,21% (47)	11,38% (14)		28,46% (35)	21,14% (26)			
CE moderadamente diferenciado	9,76% (12)	6,50% (8)	3,25% (4)		6,50% (8)	3,25% (4)			
CE pobremente diferenciado	5,69% (7)	3,25% (4)	2,44% (3)		3,25% (4)	2,44% (3)			
CE microinvasivo	6,50% (8)	5,69% (7)	0,81% (1)		4,06% (5)	2,44% (3)			
Origen tumoral								0,3134	0,9016
CV Unilateral	85,73% (105)	65,85% (81)	19,51% (24)	0,956	50,41% (62)	34,96% (43)	0,662		
CV Bilateral	6,5% (8)	4,88% (6)	1,63% (2)		4,88% (6)	1,63% (2)			
Comisura Anterior	7,32% (9)	5,69% (7)	1,63% (2)		4,88% (6)	2,44% (3)			
Comisura Posterior	0,81% (1)	0,81% (1)	0% (0)		0,81% (1)	0% (0)			
Tamaño								0,572	0,103
T1	59,35% (73)	46,34% (57)	13,01% (16)	0,304	35,77% (44)	23,58% (29)	0,142		
T2	13,82% (17)	11,38% (14)	2,44% (3)		5,69% (7)	8,13% (10)			
T3	17,07% (21)	11,38% (14)	5,69% (7)		11,38% (14)	5,69% (7)			
T4	9,76% (12)	8,13% (10)	1,63% (2)		8,13% (10)	1,63% (2)			

Característica	Global	VPH -	VPH +	p	p16 -	p16 +	p	SV. GLOBAL	SV. LIBRE ENFERMEDAD
AFECTACIÓN GANGLIONAR								0,0063¹ / 0,08²	0,345
0	95,93% (118)	74,80% (92)	21,14% (26)	0,103	56,91% (70)	39,02% (48)	0,892		
1	0,81% (1)	0% (0)	0,81% (1)		0,81% (1)	0% (0)			
2A	0,81% (1)	0,81% (1)	0% (0)		0,81% (1)	0% (0)			
2B	0,81% (1)	0% (0)	0,81% (1)		0,81% (1)	0% (0)			
2C	1,63% (2)	1,63% (2)	0% (0)		1,63% (2)	0% (0)			
ESTADIO TUMORAL								0,318	0,0936
1	59,63% (73)	46,34% (57)	13,01% (16)	0,508	35,77% (44)	23,58% (29)	0,077		
2	12,01% (16)	11,38% (14)	1,63% (2)		4,88% (6)	8,13% (10)			
3	17,07% (21)	11,38% (14)	5,69% (7)		11,38% (14)	5,69% (7)			
4	10,57% (13)	8,13% (10)	2,44% (3)		8,94% (11)	1,63% (2)			
RECIDIVA								0,825	0,0001
NO	71,54% (88)	55,28% (68)	16,26% (20)	0,988	37,4% (46)	34,15% (42)	0,002		
SI	28,46% (35)	21,95% (27)	6,5% (8)		23,58% (29)	4,88% (6)			
LUGAR DE LA RECIDIVA								0,0309	0,0000
No recidiva	72,36% (88)	56,1% (68)	16,26% (20)	0,873	37,4% (46)	34,96% (43)	0,002		
Local	19,51% (24)	16,26% (20)	4,06% (4)		16,26% (20)	3,25% (4)			
Ganglionar	8,13% (10)	5,69% (7)	2,44% (3)		7,32% (9)	0,81% (1)			

¹ Estratificado en afectación ganglionar 0, 1, 2A, 2B, 2C

² Estratificado en afectación ganglionar SI o NO.

Característica	Global	VPH -	VPH +	p	p16 -	p16 +	p
Supervivencia global				0,56			0,771
A los 3 años (% [IC])	87,13% [IC 79,54 – 92,04]	86,97% [IC 78,19 – 92,39]	87,62% [IC 66,28 – 95,84]		84,32% [IC 73,45 – 91]	91,57% [IC 79,08 – 96,75]	
A los 5 años (% [IC])	77,20% [IC 68,06 – 84,02]	80,68% [IC 70,69 – 87,56]	63,95% [IC 40,4 – 80,21]		74,89% [IC 62,67 – 83,61]	80,84% [IC 65,03 – 90,02]	
A los 10 años (% [IC])	65,44% [IC 55,02 – 74,01]	67,28% [IC 55,44 – 76,63]	58,13% [IC 34,4 – 75,9]		65,21% [IC 51,77 – 75,76]	65,14% [IC 47,07 – 78,37]	
Supervivencia libre de enfermedad				0,943			0,0022
A los 3 años (% [IC])	79,13% [IC 70,45 – 85,52]	79,82% [IC 69,86 – 86,8]	76,77% [IC 55,26 – 88,89]		72,45% [IC 60,21 – 81,49]	89,44% [IC 76,47 – 95,47]	
A los 5 años (% [IC])	71,93% [IC 62,10 – 79,63]	72,28% [IC 61,01 – 80,79]	71,29% [IC 48,38 – 85,41]		61,31% [IC 48,01 – 72,17]	89,44% [IC 76,47 – 95,47]	
A los 10 años (% [IC])	67,28% [IC 56,58 – 75,89]	66,65% [IC 54,37 – 76,33]	71,29% [IC 48,38 – 85,41]		54,27% [IC 40,3 – 66,3]	89,44% [IC 76,47 – 95,47]	

TABLAS DE DATOS: *Cohortes*

Característica	1.1 [VPH – p16 –]	1.2 [VPH – p16 +]	2.1 [VPH + p16 –]	2.2 [VPH + p16 +]	p
% (n)	49,59% (61)	27,64% (34)	11,38% (14)	11,38% (14)	0,176
Edad: \bar{X} años (rango)	63,82 (39-86)	60,59 (45-78)	61,14 (41-82)	61,07 (33-83)	0,611
Año de diagnóstico					
<i>Por cuartiles</i>					0,654
1978-1992	12,19% (15)	7,32% (9)	4,07% (5)	4,88% (6)	
1993-1995	13,01% (16)	8,13% (10)	2,44% (3)	2,44% (3)	
1996-1997	12,19% (15)	4,07% (5)	1,63% (2)	2,44% (3)	
1997-2005	12,19% (15)	8,13% (10)	3,25% (4)	1,63% (2)	
<i>Por años</i>					0,794
1978-1984	1,63% (2)	0% (0)	1,63% (2)	0% (0)	
1985-1991	4,88% (6)	4,88% (6)	0,81% (1)	4,07% (5)	
1992-1998	32,52% (40)	15,45% (19)	5,69% (7)	5,69% (7)	
1999-2005	12,2% (15)	8,13% (10)	3,25% (4)	1,63% (2)	
Tabaco $\bar{X} \pm DE$ cig/día (n)	29,2 \pm 16,2 (56)	31,9 \pm 17,13 (29)	27,86 \pm 13,11 (14)	27,08 \pm 14,53 (12)	0,772
Alcohol $\bar{X} \pm DE$ UA/día (n)	2,19 \pm 1,27 (46)	2 \pm 1,41 (24)	2,33 \pm 1,07 (12)	2,4 \pm 1,35 (10)	0,84
Oncogenicidad del VPH					0,067
Bajo riesgo	-	-	0% (0)	2,44% (3)	
Alto riesgo	-	-	11,38% (14)	8,94% (11)	
Histología (Carcinoma epidermoide)					0,692
Sin especificar diferenciación	15,45% (19)	8,13% (10)	3,25% (4)	1,63% (2)	
Pobrementemente diferenciado	1,63% (2)	1,63% (2)	1,63% (2)	0,81% (1)	
Moderadamente diferenciado	5,69% (7)	0,81% (1)	0,81% (1)	2,44% (3)	
Bien diferenciado	23,58% (29)	14,63% (18)	4,88% (6)	6,5% (8)	
Microinvasivo	3,25% (4)	2,44% (3)	0,81% (1)	7,32% (9)	

Característica	1.1 [VPH – p16 –]	1.2 [VPH – p16 +]	2.1 [VPH + p16 –]	2.2 [VPH + p16 +]	p
Síntoma principal					0,236
Disfonía	46,34% (57)	25,2% (31)	10,57% (13)	11,38% (14)	
Disnea	2,44% (3)	0% (0)	0% (0)	0% (0)	
Odinofagia	0% (0)	0% (0)	0,81% (1)	0% (0)	
Tiempo síntoma principal $\bar{x} \pm DE$ días (n)	7,58 \pm 10,68 (52)	8,77 \pm 10,2 (26)	9,78 \pm 12,59 (14)	8,38 \pm 9,69 (13)	0,869
Origen tumoral					0,741
CV Unilateral	39,84% (49)	26,02% (32)	10,57% (13)	8,94% (11)	
CV Bilateral	4,07% (5)	0,81% (1)	0,81% (1)	0,81% (1)	
Comisura Anterior	4,88% (6)	0,81% (1)	0% (0)	1,63% (2)	
Comisura Posterior	0,81% (1)	0% (0)	0% (0)	0% (0)	
Tamaño tumoral (T)					0,012
T1	29,27% (36)	17,07% (21)	6,5% (8)	6,5% (8)	
T2	3,25% (4)	8,13% (10)	2,44% (3)	0% (0)	
T3	9,76% (12)	1,63% (2)	1,63% (2)	4,07% (5)	
T4	7,32% (9)	0,81% (1)	0,81% (1)	0,81% (1)	
Afectación ganglionar					0,092
0	47,15% (58)	27,64% (34)	9,76% (12)	11,38% (14)	
1	0% (0)	0% (0)	0,81% (1)	0% (0)	
2A	0,81% (1)	0% (0)	0% (0)	0% (0)	
2B	0% (0)	0% (0)	0,81% (1)	0% (0)	
2C	1,63% (2)	0% (0)	0% (0)	0% (0)	

Característica	1.1 [VPH – p16 –]	1.2 [VPH – p16 +]	2.1 [VPH + p16 –]	2.2 [VPH + p16 +]	p
Estadio tumoral					0,02
1	29,27% (36)	17,07% (21)	6,5% (8)	6,5% (8)	
2	3,25% (4)	8,13% (10)	1,63% (2)	0% (0)	
3	9,76% (12)	1,63% (2)	1,63% (2)	4,07% (5)	
4	7,32% (9)	0,81% (1)	1,63% (2)	0,81% (1)	
Recidiva (SI/NO)					0,003
NO	32,52% (40)	22,76% (28)	4,88% (6)	11,38% (14)	
SI	17,07 (21)	4,88% (6)	6,5% (8)	0% (0)	
Lugar de recidiva					0,009
NO recidiva	32,52% (40)	23,58% (29)	4,88% (6)	11,38% (11)	
Local	12,19% (15)	3,25% (4)	4,06% (5)	0% (0)	
Ganglionar	4,88% (6)	0,81% (1)	2,44% (3)	0% (0)	

Característica	1.1 [VPH – p16 –]	1.2 [VPH – p16 +]	2.1 [VPH + p16 –]	2.2 [VPH + p16 +]	p
Supervivencia global					0,92
A los 3 años (% [IC])	84,81% [IC 72,82-91,79]	91,08% [IC 74,83-97,03]	80,81% [IC 42,35-94,85%]	92,68% [IC 59,08-99,96%]	
A los 5 años (% [IC])	77,35% [IC 64,13-86,2%]	87,29% [IC 69,33-95,08%]	60,61% [IC 25,8-83,1%]	65,66% [IC 31,77-85,7%]	
A los 10 años (% [IC])	65,86% [IC 50,98-77,19%]	69,56% [IC 47,48-83,78%]	60,61% [IC 25,8-83,1%]	54,71% [22,11-78,59%]	
Supervivencia libre de enfermedad					0,0006
A los 3 años (% [IC])	77% [IC 63,66-85,96%]	85,01% [67,65-93,47%]	51,95% [22,34-75,11%]	100%	
A los 5 años (% [IC])	65,96% [IC 51,24-77,18%]	85,01% [67,65-93,47%]	38,96% [IC 11,48-66,34%]	100%	
A los 10 años (% [IC])	57,66% [42,01-70,51%]	85,01% [67,65-93,47%]	38,96% [IC 11,48-66,34%]	100%	

CONTRASTE DE HIPÓTESIS Y DISCUSIÓN

CONTRASTE DE HIPÓTESIS

En base a las hipótesis de trabajo establecidas en la fase de diseño del estudio, una vez concluido el mismo y extraídos los resultados, se procedió al contraste de dichas hipótesis:

- **La prevalencia de VPH en el CEL-G alcanza el 25-35%.**

✗ La prevalencia de VPH obtenida en nuestro estudio fue 22,76%, levemente menor a la establecida por estudios previamente a 2010(12, 14-20, 26). Sin embargo, la prevalencia obtenida en nuestro estudio es idéntica a la descrita por autores posteriormente a 2010(22-24) o en metanálisis(26-30), que alcanza el 22,1-28%.

- **La presencia del p16 en el CEL-G es de 25-30%.**

✗ La prevalencia de p16 obtenida en nuestro estudio fue 39,02%, levemente mayor a la de estudios previos al diseño del estudio(276, 318) y notablemente mayor que estudios recientes(40, 44-47). Probablemente el método de detección e interpretación de los resultados sea la causa de la variabilidad de la presencia de p16. Los resultados difieren debido a las diferencias en los criterios utilizados para la establecer la positividad(46). En algunos estudios la expresión de p16 se puntuó positiva solamente cuando se observó tinción citoplasmática y nuclear fuerte y difusa en todas las células basales y suprabasales, en todos los nidos de tumor. Otros estudios definen la expresión de p16 en los tumores como fuerte y difusa cuando $\geq 70\%$ de las células (citoplasma y núcleos) están teñidas(244, 348), como en nuestro estudio; mientras que Fischer evaluó los tumores como p16 + cuando $\geq 5\%$ de las células eran inmunopositivas(349).

- **La prevalencia del p16 es mayor en las muestras VPH+.**

✗ La distribución de las cohortes positivas para p16, 1.2 y 2.2, demuestra que no es más frecuente la positividad al p16 en las muestras VPH+, como se había postulado con anterioridad(40, 318). Se encontraron más muestras positivas a p16 en la cohorte con VPH -, 34 (27,64%), vs. 14 (11,38%) en la VPH +.

- **El serotipo más frecuente es el VPH16 (14-16, 29).**

✓ El serotipo más frecuente fue el 16 (21,43%, n=6). Los siguientes en frecuencia fueron el 66 (21,43%, n=6), seguidos por el 31 (17,86%, n=5) y el 53 (14,28%, n=4), acordes con otras series donde el segundo más prevalente, hecho que es confirmado en estudios(22-25) y metanálisis recientes(26, 27, 29, 30, 277).

- **Teniendo en cuenta el aumento de la transmisión del virus en las últimas décadas, la prevalencia del VPH en el CEL, presenta una tendencia creciente(8, 110, 113, 270, 271).**

✗ Se ha constatado *a posteriori*, mediante metanálisis y metaregresiones, que el CEOF presenta una tendencia creciente en el tiempo en su incidencia(4, 29, 271). Sin embargo, dicho aumento de prevalencia no se observó en los CEL(29, 271), coherentemente con los datos de nuestro estudio donde no se observó una tendencia creciente a la aparición del carcinomas VPH + a lo largo del tiempo, tanto en la distribución por cuartiles de pacientes ($p=0,276$) como en grupos homogéneos de tiempo ($p=0,1789$).

- **La presencia del VPH no influye en la supervivencia global y/o libre de enfermedad(16, 19, 316).**

✓ En nuestra serie los tumores VPH + no asociaron una mejor supervivencia global ($p=0,5598$) ni en la supervivencia libre de enfermedad ($p=0,7714$). Hecho también postulado por otros autores recientemente(16, 19, 24, 32).

- **Los pacientes VPH+ y p16+ asocian una supervivencia global y libre de enfermedad a los 5 y 10 años mayor que las cohortes VPH -.**

✗ Al contrario por lo postulado por otros autores(37), la cohorte que peor supervivencia global presentó a largo plazo fue la 2.2 (VPH+ y p16+) y la que mejor fue la 2.1 (VPH+ p16-). Sin embargo, estas diferencias no resultaron significativas ($p=0,9202$)

✓ Por otro lado, si se encontró una influencia intensamente significativa ($p=0,0006$) en la supervivencia libre de enfermedad, donde la cohorte 2.2 presentó la mejor supervivencia libre de enfermedad, sin presentar ningún evento a lo largo del seguimiento, es decir, una supervivencia libre de enfermedad del 100%.

- **Los pacientes con tumores VPH dependientes presentan una menor frecuencia de hábito tabáquico-alcohólico(55, 294).**

✗ No se evidenció una relación significativa entre el consumo de tabaco y la presencia del VPH($p=0,427$), del p16 ($p=0,782$) o de la cohorte asignada ($p=0,772$).

✗ No se evidenció una relación significativa entre el consumo de alcohol y la presencia del VPH($p=0,761$), del p16 ($p=0,817$) o de la cohorte asignada ($p=0,84$).

DISCUSIÓN

El interés acerca de la implicación del VPH en el CECyC es creciente en las últimas décadas. Con un número de estudios notables en el CEOF, el estudio centrado únicamente en el CEL es mucho más limitado(12-25) y poco contrastado. Además, uno de los principales sesgos de selección de las muestras de laringe es que, en muchos casos, se incluyen datos de tumores hipofaríngeos(26, 29), sin poder extraer de manera unitaria los datos únicamente laríngeos. Por ahora, sólo en un metanálisis se analiza el RR de la infección por VPH y la génesis del CEL, el de Li(28). En éste se indica que a pesar de que la prevalencia ponderada del VPH en el CEL fue del 28%, inferior a los CECyC (34,5%) o los CEOF (45,8%)(26, 271), la asociación entre la infección por VPH y el riesgo de cáncer laríngeo es fuerte, con una RR de 5,39, mayor que la del CEOF (OR, 4,3) y CECyC (OR, 2,0)(315).

El VPH utiliza la maquinaria celular en su propio beneficio, insertando su genoma en la célula *stem* epitelial. No obstante, la mayoría de las personas es capaz de eliminar la infección sin ninguna manifestación clínica, y sólo el 10% de las personas infectadas desarrollan lesiones(212). Por ello, todavía quedan muchos factores por conocer que expliquen el porqué de la persistencia de la infección vírica y su consecuente oncogénesis. Sin embargo, su implicación en la oncogénesis de los tumores de cabeza y cuello; y su relación con el tratamiento y el pronóstico está tan establecido que, incluso, en la última actualización del TNM, confeccionado por la AJCC y la UICC, se ha incluido una clasificación diferente para los CEOF VPH +(49), diferenciándolos como entidades diferentes, en función de la positividad al p16. No cabe duda que, en breve, ocurrirá lo mismo con otras sublocalizaciones de la cabeza y cuello, como la laringe.

Existen varias metodologías disponibles para el estudio de la presencia del VPH, ya sea en biopsias frescas congeladas o conservadas en parafina(37). Entre ellas encontramos como más utilizadas la PCR y la HIS. En la última década se había comenzado a postular que los resultados de estudios de prevalencia en base a PCR eran irreales, si se los comparaba con un método más realista, como era la HIS(242). Sin embargo, un reciente metanálisis postula que la variabilidad en las tasas de detección del VPH no son debidas al método de detección seleccionado, sino a variaciones geográficas de los estudios analizados(30). En nuestro estudio utilizamos la técnica de PCR por ser la que habitualmente se utiliza en nuestro hospital y por contar con una amplia experiencia en la misma.

La confirmación de la presencia del ADN del VPH en las biopsias de los tumores, sin embargo, no implica una relación causal suficiente. Dentro de los métodos de detección de la transcripción, actualmente se dispone principalmente de la determinación inmunohistoquímica de la proteína p16 y la detección del ARNm que codifica las proteínas E6/E7. Entre ellas, actualmente la detección de ARNm E6/E7 es considerado el *gold standard* para diferenciar un VPH clínicamente relevante(29, 33, 34, 242). Sin embargo, la determinación del ARNm puede verse afectada por los métodos de preservación de tejidos, dado que las muestras parafina pueden sufrir la degradación de los ácidos nucleicos durante la fijación y almacenamiento(29); además de que no es una prueba que se haya estandarizado su uso en la práctica clínica hospitalaria diaria. Por ello, la determinación inmunohistoquímica del p16 es considerado un método de detección del VPH aceptable y plausible, distinguiendo a los tumores VPH-dependientes(34, 37, 42, 43, 246, 247). Tal y como se ha comentado anteriormente, dicha positividad al p16 ya supone, en la última clasificación TNM(49), un hecho diferencial, con estadiaje y pronóstico diferentes.

Sin embargo, los resultados de la positividad al p16 difieren mucho entre las series, debido a las diferencias en los criterios utilizados para la establecer la positividad(46) y qué porcentaje de presencia de la tinción al p16 supone realmente una muestra positiva. Actualmente, al igual que en nuestro estudio, se establece que si la tinción es positiva en $\geq 70\%$ de las células (citoplasma y núcleo) puede considerarse una muestra positiva para p16(244, 348).

Como se ha ido describiendo, la discrepancia entre presencia del VPH *simple* y presencia de VPH *transcripcional* es la que provoca las diferencias de prevalencia entre unos estudios y otros. La prevalencia media del VPH *simple* alcanzaba en el CEL un 22,1-28% según los metanálisis publicados(26-30), o en series con más de 75 casos, presentaba una franja de prevalencia muy amplia 4,9-58,8%(12-25). A pesar de que algunas series presentan un sesgo de selección al incluir la hipofaringe dentro de la laringe, los resultados se correlacionan con los datos obtenidos de nuestro estudio, donde la prevalencia del VPH alcanzó el 22,76%; mientras que la prevalencia de VPH-AR alcanzó el 20,32%.

Cuando la prevalencia se medía en función de la actividad transcripcional podía realizarse mediante p16 o mRNA E6/E7, obteniéndose una evidente menor prevalencia, del 19,1% (para el p16)(26) u 8,6% (para el mRNA)(29). Ambos datos son coherentes con los obtenidos en nuestro estudio donde la prevalencia del VPH transcripcional, es decir muestras VPH + y p16 + (cohorte 2.2), alcanzó el 11,38% (n=14).

Está confirmado, a través de metanálisis y metaregresiones, que existe una tendencia creciente en la incidencia del CEOF VPH +, con un aumento a lo largo del tiempo(4, 29, 110, 113, 270, 271); hecho que no se ha llegado a confirmar en el CEL(29, 271). Este hecho se confirma en nuestro estudio donde se observa una presencia del VPH homogénea y ausente de algún tipo de tendencia bajista o alcista a lo largo de los años.

Los serotipos relacionados con el CEL son mucho más diversos que en los CEOF, incluyendo(17, 19, 27, 29, 32, 36, 43, 276, 281, 322) a VPH de bajo riesgo oncogénico (VPH6 y VPH11), VPH de alto riesgo oncogénico, establecido y probable (VPH16, VPH18, VPH26, VPH31, VPH33, VPH35, VPH45, VPH51, VPH52, VPH56, VPH58, VPH59, VPH66, VPH68, VPH73 y VPH82) e, incluso, de riesgo oncogénico indeterminado (VPH19, VPH21, VPH22, VPH36, VPH38, VPH39, VPH41, VPH67, VPH69, VPH75 y VPH76). En nuestra serie se encontraron los serotipos VPH43 y VPH62, nunca antes descritos en la bibliografía en la laringe. Los dos, α -papilomavirus 3 y 8, se clasifican como de bajo riesgo oncogénico, estando generalmente descritos en la piel y las mucosas, raramente en las lesiones de la cabeza y el cuello.

El VPH más comúnmente detectado en el CEL es VPH16(12, 14-16, 19-27, 30, 38, 40, 281, 297, 315-317) hecho constatado en nuestra serie que encontró como serotipos más frecuentes, con la misma prevalencia, al VPH16 y VPH66. Generalmente, VPH18 el segundo serotipo más frecuente (15, 17, 19, 25, 27, 29, 297), pero en nuestra serie este serotipo no fue demostrado en ninguna muestra. Por otro lado, en muchos estudios se certificó la coexistencia de varios serotipos en una misma muestra(14, 15, 18, 22-24, 29, 297), hecho compartido por nuestra serie que llegó a encontrar cinco muestras con dos serotipos y en una muestra con tres serotipos. Si se hace la distinción entre VPH-AR y VPH-BR, los más frecuentemente detectados son los de alto riesgo. Esto probablemente pueda verse sesgado dado que algunos autores solamente utilizan sistemas de detección de VPH-AR, sin estudiar VPH-BR(13, 15, 17, 19, 20). En nuestro caso la mayoría de las muestras presentaron VPH-AR (89,2%, n=25).

La presencia del p16 en los CEL es muy variable, dependiendo de los criterios de positividad establecidos por cada autor. Se postula que de los subtipos no orofaríngeos, la laringe es la

sublocalización anatómica que más presencia del p16 demuestra(53), con una positividad del 86,3% en el último metanálisis publicado(29). En las series revisadas, con más de 45 muestras, el rango de prevalencia del p16 en el CEL es notablemente menor, de 6,5-28%(40, 44-47). En nuestra serie la positividad al p16 alcanzó el 39,02%, que cuando se enfrentaba a la positividad al VPH (cohorte 2.2) alcanzaba el 11,38%. De manera coherente con lo previamente publicado, no se observó una tendencia creciente de la positividad al p16 a lo largo del tiempo, encontrándose una distribución homogénea en los años estudiados(53).

Algunos postulados previos describían que los CEOF VPH + eran más prevalentes en pacientes jóvenes(29, 107, 110), hecho que no se ha constatado en el CEL(16, 29, 32, 57). En nuestro estudio, la edad al diagnóstico no se relacionó significativamente con la presencia del VPH. En las series revisadas, el género del paciente no influía en la presencia del VPH en el CEL, siendo su prevalencia similar en hombres y mujeres(28, 29, 32). Como consecuencia del número de mujeres en nuestra base de datos oncológica general (0,83%) y el muestreo aleatorio, ninguna mujer fue incluida en nuestro estudio, por lo que no pudieron extraerse conclusiones a este respecto.

La serie publicada con mayor número de pacientes de CEL(25) reveló que el CEL VPH + es significativamente más frecuente entre los no fumadores, no bebedores y de origen supraglótico. Ningún metanálisis publicado hace referencia a cofactores como el consumo de tabaco o alcohol, el género o las prácticas sexuales. Al contrario que la serie de Xu(25), en nuestro estudio no se relacionó la presencia del VPH con el consumo de tabaco o alcohol, de manera grosera o estratificada por el grado de consumo.

De igual modo, las series revisadas de CEL, no encuentran una relación significativa entre la positividad al VPH y las características tumorales al diagnóstico (tamaño, afectación ganglionar, metástasis). Esto es constatado en nuestro estudio donde no se encontró relación significativa del VPH con ninguna de estas covariables además de otras no referidas previamente como el subtipo histológico del CEL o el origen dentro de la glotis; además del síntoma referido por el paciente, el tiempo de evolución de dicho síntoma o la profesión del paciente, agrupada según el CNAE.

Al igual que con el VPH, la presencia del p16 no se vio determinada por factores epidemiológicos (edad, síntoma, tiempo de evolución del síntoma, profesión, consumo de tabaco o alcohol) y/o tumorales (origen, subtipo histológico, tamaño, afectación ganglionar o estadio). De igual modo no se constató una tendencia alcista o bajista de la presencia del p16 a lo largo del tiempo estudiado.

Sin embargo, cuando se estudiaba la relación del VPH y el p16 en cohortes, se reveló que las cohortes resultaban factores influyentes en el tamaño ($p=0,012$) y el estadio tumoral ($p=0,02$). De este modo se observó como la cohorte VPH – y p16 – (1.1) se relacionaba más frecuentemente con tamaños T3 y T4, y eran coherentemente clasificados como Estadio III y IV. Por otro lado, la mayoría de pacientes de las cohortes positivas para VPH, 2.1 y 2.2, presentaron un Estadio I.

Se dispone de muy pocos estudios de supervivencia asociada al VPH en el CEL, en los que el seguimiento suele ser máximo de 3 años(40) o 5 años(16, 19, 24, 32); con muy pocos con un estudio de supervivencia a largo plazo (más de 7-10 años)(25, 57). Del mismo modo, no se dispone de muchas series que asocien un seguimiento prolongado en el estudio del p16 en el CEL, casi nunca mayor a 5 años(44). Adicionalmente, algunos autores no diferencian la laringe de otras sublocalizaciones o la engloban dentro del término de localización “no orofaríngea”, causando una pérdida de especificidad

estadística(44, 53). Ambas limitaciones quedan descartadas en nuestra serie dado que se realiza un estudio específico del VPH y p16 en el CEL-G, con un seguimiento medio de 18,39 años, y con un índice de fuga muy bajo.

Al igual que lo encontrado en nuestros resultados, los estudios de SvG del VPH en el CEL, generalmente, no encontraron ninguna diferencia en la supervivencia(16, 19, 24, 32, 56, 323) o, si la encontraron fue ligera y no significativa(25, 57).

La presencia del p16 en el CEL se ha asociado a mejores tasas de SvG(40, 45, 48), pero se dispone de muy pocos estudios de supervivencia a largo plazo(25, 44, 57). Por el contrario, Larque(46) estudió la influencia del p16 en casos confirmados VPH -, evidenciando que las muestras p16 + presentaban una peor SvG que las muestras p16 -. En nuestra serie, el p16 no tenía influencia en la SvG, al igual que lo postulado por otros autores(47, 48, 53, 305).

La presencia de muestras VPH+ y p16+ se asociaba en alguna serie con una mayor SvG, de manera significativa(53, 323). Al contrario, en nuestra serie la cohorte que peor SvG presentó a largo plazo fue la 2.2 (VPH+ y p16+) y la que mejor fue la 2.1 (VPH+ p16-). Sin embargo, estas diferencias no resultaron significativas, lo cual confirma que el VPH y el p16 no resultaron ser factores determinantes en la SvG y que la pertenencia a una cohorte concreta no asociaba mejores tasas de SvG.

Por otro lado, en nuestra serie, la SvG se vio influenciada significativamente por la edad del paciente, el síntoma referido en la primera consulta, el consumo de tabaco y el lugar de recidiva. La edad del paciente al diagnóstico resultó ser un factor determinante, de modo que por cada año aumentaba un 3,75% la posibilidad de muerte. Este hecho no está claramente reflejado en la gran mayoría de series aunque se postula que la mayor mortalidad se da en personas de edad avanzada(142, 355). Dentro de los estudios que lo detallan específicamente destaca la serie de Megwalu(356), donde se confirma significativamente que la edad influye en la SvG con un HR idéntico (1,03).

De igual modo, el síntoma de consulta resultó ser un factor significativo para la SvG ($p=0,0441$), sin poderse establecer una razón de riesgo significativa para cada uno de los síntomas ($p=0,1283$). Los pacientes con disnea presentaron muertes más precoces, mientras que el único paciente que refirió odinofagia, no falleció durante el seguimiento. La disfonía se confirmó como el síntoma más frecuente referido por pacientes con tumores laríngeos de origen glótico.

El consumo de tabaco resultó ser un factor determinante para la SvG, de modo que por cada cigarrillo que el paciente reconocía fumar al día, el riesgo de fallecer se incrementaba un 2,86%. Este hecho fue previamente descrito en la laringe, destacando un efecto multiplicativo con el alcohol(74); hecho no confirmado en nuestra serie, donde el tabaco y el alcohol actuaron como factores independientes.

Por último, el lugar de recidiva también resultó determinante en la SvG ($p=0,0309$) encontrando que las recidivas ganglionares presentaron peor supervivencia que las locales, hecho previamente postulado por Wong(357).

El estudio de las recidivas está poco pormenorizado en la literatura. Parece que en los CEOF VPH + el riesgo de recidiva es menor(246). Lassen encontró al p16 como un factor protector para recidivas locoregionales en pacientes tratados solamente con RT; evidenciándose mejores tasas de supervivencia global y libre de enfermedad, que en los p16 -(307). En nuestro estudio, tal y como se ha explicado anteriormente, el VPH no se reveló como un factor determinante en la aparición de recidivas

del CEL. Por el contrario, el p16 resultó ser un factor significativamente protector de recidivas, con influencia notable sobre la supervivencia libre de enfermedad.

En nuestra serie, el estudio de las recidivas reveló que estaba influenciado por la cohorte asignada, confirmando que las cohortes con p16+ presentaban menos recidivas en durante el seguimiento y preferentemente locales. Por otro lado el lugar de la recidiva se relacionó significativamente con el tamaño tumoral, evidenciando que los tamaños menores (T1 y T2) no presentaban recidivas o de presentarlas, la gran mayoría eran recidivas locales. Por el contrario, tamaños mayores (T3 y T4) si presentaban recidivas eran principalmente ganglionares. De manera coherente, el estadio tumoral y el lugar de la recidiva presentaron una relación estadísticamente significativa evidenciando que la mayoría de las recidivas locales se daban en Estadio I y la mayoría de las recidivas ganglionares se daban en Estadio III.

El lugar de recidiva supuso un factor determinante en la supervivencia global ($p=0,0309$) evidenciándose que las recidivas ganglionares presentaban una peor supervivencia que las locales; y que, de manera coherente, las muestras sin recidiva presentaban una mejor supervivencia global.

La SvLE no parece verse influenciada por la presencia del VPH o del p16, con resultados completamente diferentes y, nunca estadísticamente significativos(44, 45, 47). En nuestra serie, el VPH no resultó ser un factor significativo en la SvLE. Sin embargo el p16 se relacionó significativamente con una mejor supervivencia libre de enfermedad, confirmando que las muestras p16 + un 76% menos de probabilidad de muerte por año que las p16 -. De este modo, las muestras p16 + presentaban significativamente un menor índice de recidivas; hecho corroborado en el CEOF previamente(53) o de manera global en el CECyC tratado solamente con RT(307). Además, en el caso de darse la recidivas en las muestras p16 +, siempre se daba antes del segundo año de seguimiento, no reportándose ninguna recidiva a partir de entonces en dicha cohorte. Este hecho nunca había sido descrito previamente. De ello se extrae, que la presencia del p16 en el CEL-G es un factor protector de recidivas y un factor determinante en la SvLE, al contrario de lo postulado anteriormente(47, 305) o de manera similar a Duray(32) que encontró que los pacientes con p16+ tuvieron una menor tasa de recurrencia local, sin ser este hecho estadísticamente significativo.

Además, el estudio de las cohortes corroboró el último postulado, encontrando que las cohortes p16+, 1.1 (VPH- y p16+) y 2.2 (VPH+ p16+) presentaban las mejores SvLE. Además, la asociación del p16 con el VPH asoció las cifras mayores de supervivencia libre de enfermedad (100%) sin eventos de pérdida de seguimiento ($p=0,0021$). Por tanto, la correlación entre VPH+ y p16 + asocia las mejores cifras de SvLE.

Analizando las limitaciones de nuestro estudio encontramos cuatro factores que deberían de mejorarse en estudios futuros: la inclusión de mujeres en el estudio estadístico, el porcentaje de muestras viables, la adaptación de cuestionarios sobre datos de índole sexual y asegurar una heterogeneidad de las muestras respecto a la afectación ganglionar.

La ausencia de mujeres en la muestra estudiada, ya se ha explicado previamente en *Material y métodos*, que es debida a la baja presencia de mujeres en la base de datos global y al muestreo aleatorio. Por tanto, en estudios futuros deberían de establecerse cohortes por géneros, para hacer un estudio comparativo entre ambos.

Deben plantearse estudios prospectivos dado que el planteamiento de estudios retrospectivos pueden plantear una ausencia de viabilidad de las muestras estudiadas, tal y como se observó en

nuestro estudio, donde sólo el 58,85% de las muestras resultaron viables para el estudio VPH y p16. Esto puede poner en tela de juicio la potencia estadística del estudio al no cumplir la N establecida en el diseño del tamaño muestral. Sin embargo, tal y como describe Goodman(358) el resultado del estudio se considera consistente al equipararse a los resultados previamente publicados en la bibliografía donde se estima una prevalencia del VPH cercana al 20-30%.

Por otro lado, estudios previos encontraron una relación significativa entre el número de parejas sexuales y la realización de sexo oral-genital, con el desarrollo de CEO(112); hecho no observado en el CEL. De hecho, recientemente se postula que dicha asociación entre el comportamiento sexual y el CECyC podría atribuirse lo confuso de los hábitos sociodemográficos y de índole sexual, más que a un efecto etiológico del VPH. La base de datos del Hospital 12 de Octubre, a la fecha de obtención de información, no presentaba cuestionario validado sobre datos epidemiológicos de origen sexual o sobre neoplasias genitales de la pareja del paciente, por lo que no se dispuso de dicha información. No obstante, la información sexual constituye una información que, pese a lo embarazoso que resulta para el médico y para el paciente, puede resultar muy interesante y suponer un dato más a la hora de la toma de decisiones sobre el tratamiento a prescribir y el seguimiento a realizar.

Por último el bajo porcentaje de N distinto a N0 encontrada en nuestra serie puede resultar confuso, pero está en relación a que los pacientes seleccionados sólo fueron tratados con cirugía y la gran mayoría fueron estadios I. Revisando las series publicadas los porcentajes de afectación ganglionar y los tratamientos aplicados son variables. En aquellas series en que el tratamiento no estaba descrito o en aquellas donde se reconocía heterogeneidad del tratamiento, el porcentaje de N0 alcanzaba el 60,57%(14, 19, 20, 22, 23, 25). Lamentablemente, en la bibliografía se dispone de muy escasas series de pacientes con CEL solo sometidos a cirugía, como la de Vlatchis(16), que presenta una afectación N0 del 91%, muy similar a la nuestra.

Nuestra serie aporta un estudio específico en localización (solamente CEL de origen glótico), homogéneo respecto al tratamiento (solamente tratado con cirugía primariamente) y con un seguimiento superior a 10 años, obteniendo una media de seguimiento de 18,39 años. Además lleva a cabo un detallado análisis de los factores epidemiológicos (edad, sexo, año de diagnóstico, profesión, síntoma de consulta y consumo de tabaco y/o alcohol), tumorales (histología, origen, tamaño, afectación ganglionar, metástasis a distancia, recidiva y lugar de recidiva) y presencia de VPH y/o p16, además de un estudio estratificado de la supervivencia global y libre de enfermedad.

CONCLUSIONES

1. La presencia del VPH en el CEL-G no tiene influencia significativa en la supervivencia global o libre de enfermedad.
2. La presencia del p16 no tiene influencia en la supervivencia global pero se relaciona significativamente con una mejor supervivencia libre de enfermedad con un 76% menos de probabilidad de muerte por año en los CEL-G p16 +.
3. La asociación del p16 con el VPH asocia las cifras mayores de supervivencia libre de enfermedad.
4. Se constata la presencia del VPH en el CEL-G, alcanzando el 22,76%, pudiéndose establecer su capacidad transcripcional, en base al estudio de la proteína p16, en un 11,38% de las muestras.
5. No se evidenció un aumento de la tendencia de infección por VPH a lo largo del tiempo.
6. Fueron encontrados 11 serotipos de virus distintos, siendo los más comunes el VPH16 y el VPH66.
7. Por primera vez se identificaron los serotipos VPH43 y VPH62 en la laringe.
8. La proteína de transcripción p16 está presente en el 39,02% de las muestras. Ésta supone un factor determinante en la aparición de recidivas y en su localización, evidenciándose que las muestras p16 + presentan menor número de recidivas. En el caso de darse la recidiva, en las muestras p16 +, siempre se da antes del segundo año de seguimiento, sin reportarse ninguna recidiva a partir de entonces.
9. La positividad al VPH y al p16, se relaciona significativamente con el tamaño y el estadio tumoral, evidenciando como la negatividad a ambos marcadores asocia tamaños y estadios mayores; mientras que su positividad asocia estadios menores.
10. Dentro de los factores epidemiológicos, el consumo de tabaco y la edad al diagnóstico resultan significativos en la supervivencia global: por cada cigarrillo que el paciente reconocía fumar al día, el riesgo de fallecer incrementa un 2,86%; y por cada año de edad al diagnóstico aumenta un 3,76% la posibilidad de muerte.

PUBLICACIONES, PREMIOS Y PRESENTACIONES ASOCIADAS AL ESTUDIO

Publicaciones

HPV in Larynx Squamous Cell Carcinoma: New Serotypes and Survival Study within 10-year Follow-up.

Sánchez Barrueco A, González Galán F, Lora Pablos D, Villacampa Aubá JM, Ballestín Carcavilla C, Cenjor Español C, Almodóvar Álvarez C. Otolaryngol Head Neck Surg. 2017 Mar 1:194599817695545. doi: 10.1177/0194599817695545.

Presentaciones

Los resultados del estudio “Influencia del VPH en el carcinoma de laringe. Estudio retrospectivo sobre la presencia del ADN del VPH, proteína transcripcional p16 y factores epidemiológicos con influencia sobre la supervivencia global y libre de enfermedad” fueron presentados parcialmente en:

- 66 Congreso SEORL (2015): **Prevalencia del Virus del Papiloma Humano en el Carcinoma Epidermoide de Laringe: Resultados de estudio retrospectivo en 123 pacientes.** Alvaro Sanchez Barrueco, Gisela Risson Pino, José Antonio Brandariz Castelo, Carlos Almodóvar Álvarez.
- I Congreso Asociación HPV (2016): **Prevalencia, implicación y supervivencia asociada al VPH en el Carcinoma Epidermoide de laringe. Estudio retrospectivo de 123 casos (1977-2005).** Sánchez Barrueco, A, Gonzalo Díaz Tapia, Jessica Santillán Coello, José Miguel Villacampa Aubá, David Lora Pablos, Carlos Almodóvar Álvarez.
- 67 Congreso SEORL (2017): **El p16 en el Carcinoma Epidermoide Glótico: factor protector de recidivas.** Gonzalo Díaz Tapia, José Miguel Villacampa Aubá, Fernando González Galán, David Lora Pablos, Carlos Cenjor Español, Carlos Almodóvar Álvarez.

Premios

El Poster “Prevalencia, implicación y supervivencia asociada al VPH en el Carcinoma Epidermoide de laringe. Estudio retrospectivo de 123 casos (1977-2005). Sánchez Barrueco, A, Gonzalo Díaz Tapia, Jessica Santillán Coello, José Miguel Villacampa Aubá, David Lora Pablos, Carlos Almodóvar Álvarez” fue premiado (**Poster premiado como comunicación oral**) en el I Congreso Multidisciplinar Asociación HPV Madrid. Hospital Clínico Universitario San Carlos. Madrid, Octubre 2016.

Bibliografía

A continuación se detalla la bibliografía referenciada en este trabajo según las normas de publicación Vancouver:

1. Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ. CA Cancer J Clin. 2009 Jul-Aug;59(4):225-49. PMID: 19474385
2. Cancer trends progress report - costs of cancer care [Internet]. Disponible en: http://progressreport.cancer.gov/doc_detail.asp?pid51&did52009&chid595&coid5926&mid5.
3. Marur S, D'Souza G, Westra WH, Forastiere AA. HPV-associated head and neck cancer: a virus-related cancer epidemic. Lancet Oncol. 2010 Aug;11(8):781-9. PMID: 20451455.
4. Simard EP, Ward EM, Siegel R, Jemal A. CA Cancer J Clin. 2012 Mar-Apr;62(2):118-28. doi: 10.3322/caac.20141. Epub 2012 Jan 4. PMID: 22281605
5. Applebaum KM, Furniss CS, Zeka A, Posner MR, Smith JF, Bryan J, et al. Lack of association of alcohol and tobacco with HPV16-associated head and neck cancer. J Natl Cancer Inst. 2007;99(23):1801-10. PMID: 18042931
6. Gillison ML. Human papillomavirus-associated head and neck cancer is a distinct epidemiologic, clinical, and molecular entity. Semin Oncol. 2004;31(6):744-54. PMID: 15599852
7. CDC - number of HPV-associated cancer cases per year [Internet]. Disponible en: <http://www.cdc.gov.ezproxy.welch.jhmi.edu/cancer/hpv/statistics/cases.htm>
8. D'Souza G, Kreimer AR, Viscidi R, Pawlita M, Fakhry C, Koch WM, et al. Case-control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer. N Engl J Med. 2007 May 10;356(19):1944-56. PMID: 17494927
9. Schillinger JA, Xu F, Sternberg MR, Armstrong GL, Lee FK, Nahmias AJ, et al. National seroprevalence and trends in herpes simplex virus type 1 in the United States, 1976-1994. Sex Transm Dis. 2004;31(12):753-60. PMID: 15608591
10. Farsi NJ, El-Zein M, Gaied H, Lee YC, Hashibe M, Nicolau B, et al. Sexual behaviours and head and neck cancer: A systematic review and meta-analysis. Cancer Epidemiol. 2015;39(6):1036-46. PMID: 26372414
11. Sethi S, Ali-Fehmi R, Franceschi S, Struijk L, van Doorn LJ, Quint W, et al. Characteristics and survival of head and neck cancer by HPV status: a cancer registry-based study. Int J Cancer. 2012 Sep 1;131(5):1179-86. PMID: 22020866
12. Syrjänen S, Syrjänen K, Mantyjarvi R, Collan Y, Karja J. Human papillomavirus DNA in squamous cell carcinomas of the larynx demonstrated by in situ DNA hybridization. ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec. 1987;49(4):175-86. PMID: 2819803
13. Cattani P, Hohaus S, Bellacosa A, Genuardi M, Cavallo S, Rovella V, et al. Association between cyclin D1 (CCND1) gene amplification and human papillomavirus infection in human laryngeal squamous cell carcinoma. Clin Cancer Res. 1998 Nov;4(11):2585-9. PMID: 9829720
14. Ma XL, Ueno K, Pan ZM, Hi SZ, Ohyama M, Eizuru Y. Human papillomavirus DNA sequences and p53 over-expression in laryngeal squamous cell carcinomas in Northeast China. J Med Virol. 1998;54(3):186-91. PMID: 9515767
15. Gorgoulis VG, Zacharatos P, Kotsinas A, Kyroudi A, Rassidakis AN, Ikononopoulos JA, et al. Human papilloma virus (HPV) is possibly involved in laryngeal but not in lung carcinogenesis. Hum Pathol. 1999;30(3):274-83. PMID: 10088545
16. Vlachtsis K, Nikolaou A, Markou K, Fountzilas G, Daniilidis I. Clinical and molecular prognostic factors in operable laryngeal cancer. Eur Arch Otorhinolaryngol. 2005 Nov;262(11):890-8. PMID: 15739081
17. de Oliveira DE, Bacchi MM, Macarenco RS, Tagliarini JV, Cordeiro RC, Bacchi CE. Human papillomavirus and Epstein-Barr virus infection, p53 expression, and cellular proliferation in laryngeal carcinoma. Am J Clin Pathol. 2006;126(2):284-93. PMID: 16891205
18. Gungor A, Cincik H, Baloglu H, Cekin E, Dogru S, Dursun E. Human papilloma virus prevalence in laryngeal squamous cell carcinoma. J Laryngol Otol. 2007 Aug;121(8):772-4. PMID: 17320003
19. Morshed K, Polz-Dacewicz M, Szymanski M, Polz D. Short-fragment PCR assay for highly sensitive broad-spectrum detection of human papillomaviruses in laryngeal squamous cell carcinoma and normal mucosa: clinico-pathological evaluation. Eur Arch Otorhinolaryngol. 2008;265 Suppl 1:S89-96. PMID: 18193443
20. Hai-rong J, Peng W, Yong L, Tao N, Xiao-song R, Bao-guo L. Detection of Human Papilloma Virus Type 16 E6 mRNA in Laryngeal Squamous Cell Carcinoma by In Situ Hybridization. Chin J Cancer Res. 2010;22(3):218-23. PMID: 25468644
21. Liu B, Lu Z, Wang P, Basang Z, Rao X. Prevalence of high-risk human papillomavirus types (HPV-16, HPV-18) and their physical status in primary laryngeal squamous cell carcinoma. Neoplasma. 2010;57(6):594-600. PMID: 20845999

22. Lee SY, Cho NH, Choi EC, Kim WS, Kim SH. Is human papillomavirus a causative factor of glottic cancer? *J Voice*. 2011;25(6):770-4. PMID: 21227643
23. Halec G, Holzinger D, Schmitt M, Flechtenmacher C, Dyckhoff G, Lloveras B, et al. Biological evidence for a causal role of HPV16 in a small fraction of laryngeal squamous cell carcinoma. *Br J Cancer*. 2013;109(1):172-83. PMID: 23778529
24. Hernandez BY, Goodman MT, Lynch CF, Cozen W, Unger ER, Steinau M, et al. Human papillomavirus prevalence in invasive laryngeal cancer in the United States. *PLoS One*. 2014 Dec 29;9(12):e115931. PLoS one. 2014;9(12):e115931. PMID: 25546150
25. Xu Y, Liu S, Yi H, Wang J, Dong P, Li X, et al. Human papillomavirus infection in 674 Chinese patients with laryngeal squamous cell carcinoma. *PloS one*. 2014;9(12):e115914. PMID: 25536405
26. Kreimer AR, Clifford GM, Boyle P, Franceschi S. Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2005 Feb;14(2):467-75. PMID: 15734974
27. Isayeva T, Li Y, Maswahu D, Brandwein-Gensler M. Human papillomavirus in non-oropharyngeal head and neck cancers: a systematic literature review. *Head Neck Pathol*. 2012 Jul;6 Suppl 1:S104-20. PMID: 22782230
28. Li X, Gao L, Li H, Gao J, Yang Y, Zhou F, et al. Human papillomavirus infection and laryngeal cancer risk: a systematic review and meta-analysis. *J Infect Dis*. 2013 Feb 1;207(3):479-88. PMID: 23175764
29. Ndiaye C, Mena M, Alemany L, Arbyn M, Castellsague X, Laporte L, et al. HPV DNA, E6/E7 mRNA, and p16INK4a detection in head and neck cancers: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Oncol*. 2014 Nov;15(12):1319-31. PMID: 25439690
30. Gama RR, Carvalho AL, Longatto Filho A, Scorsato AP, Lopez RV, Rautava J, et al. Detection of human papillomavirus in laryngeal squamous cell carcinoma: Systematic review and meta-analysis. *Laryngoscope*. 2016 Apr;126(4):885-93. PMID: 26542064
31. Humans IWGotEoCrt. Human papillomaviruses. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans / World Health Organization, International Agency for Research on Cancer. 2007;90:1-636.
32. Duray A, Descamps G, Arafa M, Decaestecker C, Rimmelink M, Sirtaine N, et al. High incidence of high-risk HPV in benign and malignant lesions of the larynx. *Int J Oncol*. 2011 Jul;39(1):51-9. PMID: 21573490
33. Fusconi M, Campo F, Gallo A, Zambetti G, Martellucci S, Seccia A, et al. Laryngeal Cancer, HPV DNA vs E6/E7 mRNA Test: A Systematic Review. *J Voice*. 2016. PMID: 27613249
34. Ang KK, Harris J, Wheeler R, Weber R, Rosenthal DI, Nguyen-Tan PF, et al. Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer. *N Engl J Med*. 2010 Jul 1;363(1):24-35. PMID: 20530316
35. Bauer JA, Trask DK, Kumar B, Los G, Castro J, Lee JS, et al. Reversal of cisplatin resistance with a BH3 mimetic, (-)-gossypol, in head and neck cancer cells: role of wild-type p53 and Bcl-xL. *Mol Cancer Ther*. 2005;4(7):1096-104. PMID: 16020667
36. Almadori G, Cadoni G, Cattani P, Galli J, Bussu F, Ferrandina G, et al. Human papillomavirus infection and epidermal growth factor receptor expression in primary laryngeal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2001 Dec;7(12):3988-93. PMID: 11751491
37. Psyrri A, Gouveris P, Vermorken JB. Human papillomavirus-related head and neck tumors: clinical and research implication. *Curr Opin Oncol*. 2009;21(3):201-5. PMID: 19370803
38. Hassumi-Fukasawa MK, Miranda-Camargo FA, Guimaraes MC, Simoes RT, Donadi EA, Soares CP, et al. Possible implication of Mdm2 as a prognostic marker in invasive laryngeal carcinoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2012 Jul;269(7):1795-804. PMID: 22310835
39. Hafkamp HC, Manni JJ, Haesevoets A, Voogd AC, Schepers M, Bot FJ, et al. Marked differences in survival rate between smokers and nonsmokers with HPV 16-associated tonsillar carcinomas. *Int J Cancer*. 2008 Jun 15;122(12):2656-64. PMID: 18360824
40. Chernock RD, Wang X, Gao G, Lewis JS, Jr., Zhang Q, Thorstad WL, et al. Detection and significance of human papillomavirus, CDKN2A(p16) and CDKN1A(p21) expression in squamous cell carcinoma of the larynx. *Mod Pathol*. 2013;26(2):223-31. PMID: 22996374
41. Kumar B, Cordell KG, Lee JS, Prince ME, Tran HH, Wolf GT, et al. Response to therapy and outcomes in oropharyngeal cancer are associated with biomarkers including human papillomavirus, epidermal growth factor receptor, gender, and smoking. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2007;69(2 Suppl):S109-11. PMID: 17848274
42. Gheit T, Abedi-Ardekani B, Carreira C, Missad CG, Tommasino M, Torrente MC. Comprehensive analysis of HPV expression in laryngeal squamous cell carcinoma. *J Med Virol*. 2014;86(4):642-6. PMID: 24374907
43. Deng Z, Hasegawa M, Aoki K, Matayoshi S, Kiyuna A, Yamashita Y, et al. A comprehensive evaluation of human papillomavirus positive status and p16INK4a overexpression as a prognostic biomarker in head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Oncol*. 2014 Jul;45(1):67-76. PMID: 24820457

44. Salazar CR, Anayannis N, Smith RV, Wang Y, Haigentz M, Jr., Garg M, et al. Combined P16 and human papillomavirus testing predicts head and neck cancer survival. *Int J Cancer*. 2014 Nov 15;135(10):2404-12. PMID: 24706381
45. Chung CH, Zhang Q, Kong CS, Harris J, Fertig EJ, Harari PM, et al. p16 protein expression and human papillomavirus status as prognostic biomarkers of nonoropharyngeal head and neck squamous cell carcinoma. *J Clin Oncol*. 2014;32(35):3930-8. PMID: 25267748
46. Larque AB, Conde L, Hakim S, Alos L, Jares P, Vilaseca I, et al. P16(INK4a) overexpression is associated with CDKN2A mutation and worse prognosis in HPV-negative laryngeal squamous cell carcinomas. *Virchows Arch*. 2015 Apr;466(4):375-82. PMID: 25652585
47. Young RJ, Urban D, Angel C, Corry J, Lyons B, Vallance N, et al. Frequency and prognostic significance of p16(INK4A) protein overexpression and transcriptionally active human papillomavirus infection in laryngeal squamous cell carcinoma. *Br J Cancer*. 2015 Mar 17;112(6):1098-104. PMID: 25688737
48. Liang C, Marsit CJ, McClean MD, Nelson HH, Christensen BC, Haddad RI, et al. Biomarkers of HPV in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res*. 2012;72(19):5004-13. PMID: 22991304
49. Lydiatt WM, Patel SG, O'Sullivan B, Brandwein MS, Ridge JA, Migliacci JC, et al. Head and Neck cancers-major changes in the American Joint Committee on cancer eighth edition cancer staging manual. *CA Cancer J Clin*. 2017 Mar;67(2):122-137. PMID: 28128848
50. National Comprehensive Cancer Network (NCCN) Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines). Head and Neck Cancers. Version 2.2016 - October 11, 2016 (<https://www.nccn.org>).
51. Dayyani F, Etzel CJ, Liu M, Ho CH, Lippman SM, Tsao AS. Meta-analysis of the impact of human papillomavirus (HPV) on cancer risk and overall survival in head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC). *Head Neck Oncol*. 2010 Jun 29;2:15. PMID: 20587061
52. Wang MB, Liu IY, Gornbein JA, Nguyen CT. HPV-Positive Oropharyngeal Carcinoma: A Systematic Review of Treatment and Prognosis. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2015 Nov;153(5):758-69. PMID: 26124261
53. D'Souza G, Anantharaman D, Gheit T, Abedi-Ardekani B, Beachler DC, Conway DI, et al. Effect of HPV on head and neck cancer patient survival, by region and tumor site: A comparison of 1362 cases across three continents. *Oral Oncol*. 2016;62:20-7. PMID: 27865368
54. Gillison ML, Koch WM, Capone RB, Spafford M, Westra WH, Wu L, et al. Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. *J Natl Cancer Inst*. 2000;92(9):709-20. PMID: 10793107
55. Fakhry C, Westra WH, Li S, Cmelak A, Ridge JA, Pinto H, et al. Improved survival of patients with human papillomavirus-positive head and neck squamous cell carcinoma in a prospective clinical trial. *J Natl Cancer Inst*. 2008;100(4):261-9. PMID: 18270337
56. Aaltonen LM, Rihkanen H, Vaheri A. Human papillomavirus in larynx. *Laryngoscope*. 2002 Apr;112(4):700-7. PMID: 12150527
57. Stephen JK, Chen KM, Shah V, Havard S, Lu M, Schweitzer VP, et al. Human papillomavirus outcomes in an access-to-care laryngeal cancer cohort. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2012 May;146(5):730-8. PMID: 22267491
58. Forastiere A, Koch W, Trotti A, Sidransky D. Head and neck cancer. *N Engl J Med*. 2001 Dec 27;345(26):1890-900. PMID: 11756581
59. Rosique López L, Mena Viveros N, Iniesta Turpín J. Capítulo 93. Anatomía y embriología de la laringe. In: Libro virtual SEORL-CCC [disponible en: <http://seorl.net/libro-virtual/>].
60. HPV and Head and Neck Cancers. Fakhry C, D'Souza G, editors: Springer India; 2015. XXI, 127 p.
61. Gupta B, Johnson NW, Kumar N. Global Epidemiology of Head and Neck Cancers: A Continuing Challenge. *Oncology*. 2016;91(1):13-23. PMID: 27245686
62. Giovino GA, Mirza SA, Samet JM, Gupta PC, Jarvis MJ, Bhala N, et al. Tobacco use in 3 billion individuals from 16 countries: an analysis of nationally representative cross-sectional household surveys. *Lancet*. 2012 Aug 18;380(9842):668-79. PMID: 22901888
63. International Agency for Research on Cancer (IARC) en EUCAN (<http://eco.iarc.fr/eucan>)
64. Chatenoud L, Garavello W, Pagan E, Bertuccio P, Gallus S, La Vecchia C, et al. Laryngeal cancer mortality trends in European countries. *Int J Cancer*. 2016 Feb 15;138(4):833-42. PMID: 26335030
65. Bosetti C, Garavello W, Levi F, Lucchini F, Negri E, La Vecchia C. Trends in laryngeal cancer mortality in Europe. *Int J Cancer*. 2006 Aug 1;119(3):673-81. PMID: 16496411
66. Bradley PJ. Laryngeal cancer in nondrinker nonsmoker young patients: a distinct pathological entity? *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*. 2016 Apr;24(2):140-7. PMID: 26679783
67. Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, et al. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013. Available at: <http://globocan.iarc.fr>.

68. Kohler BA, Sherman RL, Howlader N, Jemal A, Ryerson AB, Henry KA, et al. Annual Report to the Nation on the Status of Cancer, 1975-2011, Featuring Incidence of Breast Cancer Subtypes by Race/Ethnicity, Poverty, and State. *J Natl Cancer Inst.* 2015;107(6):djv048. PMID: 25825511
69. Engholm G, Ferlay J, Christensen N, et al. NORDCAN: Cancer Incidence, Mortality, Prevalence and Survival in the Nordic Countries, Version 7.1 (09.07.2015). Association of the Nordic Cancer Registries. Danish Cancer Society. Disponible en: <http://www.ancr.nu>.
70. Rossi S, Baili P, Capocaccia R, Caldora M, Carrani E, Minicozzi P, et al. The EUROCARE-5 study on cancer survival in Europe 1999-2007: database, quality checks and statistical analysis methods. *Eur J Cancer.* 2015 Sep 6. pii: S0959-8049(15)00776-5. PMID: 26421815
71. Lefebvre J.-L., Chevalier D. *Cancers du larynx*. EMC (Elsevier SAS, Paris), Oto-rhino-laryngologie, 20-710-A-10, 2005.
72. Mannelli G, Cecconi L, Gallo O. Laryngeal preneoplastic lesions and cancer: challenging diagnosis. Qualitative literature review and meta-analysis. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2016 Oct;106:64-90. PMID: 27637353
73. Gandini S, Botteri E, Iodice S, Boniol M, Lowenfels AB, Maisonneuve P, et al. Tobacco smoking and cancer: a meta-analysis. *Int J Cancer.* 2008 Jan 1;122(1):155-64. PMID: 17893872
74. Menvielle G, Luce D, Goldberg P, Bugel I, Leclerc A. Smoking, alcohol drinking and cancer risk for various sites of the larynx and hypopharynx. A case-control study in France. *Eur J Cancer Prev.* 2004 Jun;13(3):165-72. PMID: 15167214
75. Szyfter K, Szmeja Z, Szyfter W, Hemminki K, Banaszewski J, Jaskula-Sztul R, et al. Molecular and cellular alterations in tobacco smoke-associated larynx cancer. *Mutat Res.* 1999 Sep 30;445(2):259-74. PMID: 10575435
76. Lee YC, Boffetta P, Sturgis EM, Wei Q, Zhang ZF, Muscat J, et al. Involuntary smoking and head and neck cancer risk: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2008 Aug;17(8):1974-81. PMID: 18708387
77. Sapkota A, Gajalakshmi V, Jetly DH, Roychowdhury S, Dikshit RP, Brennan P, et al. Smokeless tobacco and increased risk of hypopharyngeal and laryngeal cancers: a multicentric case-control study from India. *Int J Cancer.* 2007 Oct 15;121(8):1793-8. PMID: 17583577
78. Bosetti C, Gallus S, Peto R, Negri E, Talamini R, Tavani A, et al. Tobacco smoking, smoking cessation, and cumulative risk of upper aerodigestive tract cancers. *Am J Epidemiol.* 2008;167(4):468-73. PMID: 18056925
79. Hashibe M, Brennan P, Benhamou S, Castellsague X, Chen C, Curado MP, et al. Alcohol drinking in never users of tobacco, cigarette smoking in never drinkers, and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. *J Natl Cancer Inst.* 2007;99(10):777-89. PMID: 17505073
80. de Menezes RF, Bergmann A, de Aguiar SS, Thuler LC. Alcohol consumption and the risk of cancer in Brazil: A study involving 203,506 cancer patients. *Alcohol.* 2015;49(7):747-51. PMID: 26298519
81. Easton DF, Peto J, Doll R. Cancers of the respiratory tract in mustard gas workers. *Br J Ind Med.* 1988;45(10):652-9. PMID: 3196660
82. Magnus K, Andersen A, Hogetveit AC. Cancer of respiratory organs among workers at a nickel refinery in Norway. *Int J Cancer.* 1982 Dec 15;30(6):681-5. PMID: 7160938
83. Kogevinas M, Sala M, Boffetta P, Kazerouni N, Kromhout H, Hoar-Zahm S. Cancer risk in the rubber industry: a review of the recent epidemiological evidence. *Occup Environ Med.* 1998;55(1):1-12. PMID: 9536156
84. Laforest L, Luce D, Goldberg P, Begin D, Gerin M, Demers PA, et al. Laryngeal and hypopharyngeal cancers and occupational exposure to formaldehyde and various dusts: a case-control study in France. *Occup Environ Med.* 2000;57(11):767-73. PMID: 11024201
85. Ahrens W, Jockel KH, Patzak W, Elsner G. Alcohol, smoking, and occupational factors in cancer of the larynx: a case-control study. *Am J Ind Med.* 1991;20(4):477-93. PMID: 1785612
86. Marchand JL, Luce D, Leclerc A, Goldberg P, Orlowski E, Bugel I, et al. Laryngeal and hypopharyngeal cancer and occupational exposure to asbestos and man-made vitreous fibers: results of a case-control study. *Am J Ind Med.* 2000;37(6):581-9. PMID: 10797501
87. Shangina O, Brennan P, Szeszenia-Dabrowska N, Mates D, Fabianova E, Fletcher T, et al. Occupational exposure and laryngeal and hypopharyngeal cancer risk in central and eastern Europe. *Am J Epidemiol.* 2006;164(4):367-75. PMID: 16801374
88. Boffetta P, Richiardi L, Berrino F, Esteve J, Pisani P, Crosignani P, et al. Occupation and larynx and hypopharynx cancer: an international case-control study in France, Italy, Spain, and Switzerland. *Cancer Causes Control.* 2003;14(3):203-12. PMID: 12814199
89. Mehta PA, Tolar J. Fanconi Anemia. In: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, Wallace SE, Amemiya A, Bean LJH, et al., editors. *GeneReviews(R)*. Seattle (WA)1993.

90. Conway DI, Peticrew M, Marlborough H, Berthiller J, Hashibe M, Macpherson LM. Socioeconomic inequalities and oral cancer risk: a systematic review and meta-analysis of case-control studies. *Int J Cancer*. 2008 Jun 15;122(12):2811-9. PMID: 18351646
91. Andersen ZJ, Lassen CF, Clemmensen IH. Social inequality and incidence of and survival from cancers of the mouth, pharynx and larynx in a population-based study in Denmark, 1994-2003. *Eur J Cancer*. 2008;44(14):1950-61. PMID: 18657968
92. Olsen MH, Boje CR, Kjaer TK, Steding-Jessen M, Johansen C, Overgaard J, et al. Socioeconomic position and stage at diagnosis of head and neck cancer - a nationwide study from DAHANCA. *Acta Oncol*. 2015;54(5):759-66. PMID: 25734503
93. Bosetti C, La Vecchia C, Talamini R, Negri E, Levi F, Dal Maso L, et al. Food groups and laryngeal cancer risk: a case-control study from Italy and Switzerland. *Int J Cancer*. 2002 Jul 20;100(3):355-60. PMID: 12115553
94. Chuang SC, Jenab M, Heck JE, Bosetti C, Talamini R, Matsuo K, et al. Diet and the risk of head and neck cancer: a pooled analysis in the INHANCE consortium. *Cancer Causes Control*. 2012 Jan;23(1):69-88. PMID: 22037906
95. International Agency for Research on Cancer. Fruit and vegetables. (IARC handbooks of cancer prevention, vol 8). Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 2003.
96. Zatonski W, Didkowska J. Closing the gap: cancer in Central and Eastern Europe (CEE). *Eur J Cancer*. 2008;44(10):1425-37. PMID: 18358713
97. Hiraki A, Matsuo K, Suzuki T, Kawase T, Tajima K. Teeth loss and risk of cancer at 14 common sites in Japanese. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2008 May;17(5):1222-7. PMID: 18483345
98. Guha N, Boffetta P, Wunsch Filho V, Eluf Neto J, Shangina O, Zaridze D, et al. Oral health and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck and esophagus: results of two multicentric case-control studies. *Am J Epidemiol*. 2007;166(10):1159-73.
99. M, Arroyo Muhr LS, Storm H, Engholm G, Dillner J, Bzhalava D. Cancer risks after solid organ transplantation and after long-term dialysis. *Int J Cancer*. 2017 Mar 1;140(5):1091-1101. PMID: 27870055
100. Vajdic CM, van Leeuwen MT. Cancer incidence and risk factors after solid organ transplantation. *Int J Cancer*.
101. Hemminki K, Dillner J. Editorial. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2009;125: vii. .
102. Bucchi D, Stracci F, Buonora N, Masanotti G. Human papillomavirus and gastrointestinal cancer: A review. *World J Gastroenterol*. 2016;22(33):7415-30. PMID: 27672265
103. Berg D, Otley CC. Skin cancer in organ transplant recipients: Epidemiology, pathogenesis, and management. *J Am Acad Dermatol*. 2002;47(1):1-17; quiz 8-20. PMID: 12077575
104. Moloney FJ, Comber H, O'Lorcain P, O'Kelly P, Conlon PJ, Murphy GM. A population-based study of skin cancer incidence and prevalence in renal transplant recipients. *Br J Dermatol*. 2006;154(3):498-504. PMID: 16445782
105. Zwald FO, Brown M. Skin cancer in solid organ transplant recipients: advances in therapy and management: part I. Epidemiology of skin cancer in solid organ transplant recipients. *J Am Acad Dermatol*. 2011;65(2):253-61; quiz 62. PMID: 21763561
106. Grulich AE, van Leeuwen MT, Falster MO, Vajdic CM. Incidence of cancers in people with HIV/AIDS compared with immunosuppressed transplant recipients: a meta-analysis. *Lancet*. 2007;370(9581):59-67. PMID: 17617273
107. Beachler DC, Abraham AG, Silverberg MJ, Jing Y, Fakhry C, Gill MJ, et al. Incidence and risk factors of HPV-related and HPV-unrelated Head and Neck Squamous Cell Carcinoma in HIV-infected individuals. *Oral Oncol*. 2014;50(12):1169-76. PMID: 25301563
108. Guiguet M, Boue F, Cadranet J, Lang JM, Rosenthal E, Costagliola D, et al. Effect of immunodeficiency, HIV viral load, and antiretroviral therapy on the risk of individual malignancies (FHDH-ANRS CO4): a prospective cohort study. *Lancet Oncol*. 2009 Dec;10(12):1152-9. PMID: 19818686
109. Coghil AE, Shiels MS, Suneja G, Engels EA. Elevated Cancer-Specific Mortality Among HIV-Infected Patients in the United States. *J Clin Oncol*. 2015;33(21):2376-83. PMID: 26077242
110. Chaturvedi AK, Engels EA, Anderson WF, Gillison ML. Incidence trends for human papillomavirus-related and -unrelated oral squamous cell carcinomas in the United States. *J Clin Oncol*. 2008;26(4):612-9. PMID: 18235120
111. D'Souza G, Agrawal Y, Halpern J, Bodison S, Gillison ML. Oral sexual behaviors associated with prevalent oral human papillomavirus infection. *J Infect Dis*. 2009 May 1;199(9):1263-9. PMID: 19320589
112. Dahlstrom KR, Li G, Tortolero-Luna G, Wei Q, Sturgis EM. Differences in history of sexual behavior between patients with oropharyngeal squamous cell carcinoma and patients with squamous cell carcinoma at other head and neck sites. *Head Neck*. 2011 Jun;33(6):847-55. PMID: 20737488
113. Smith EM, Ritchie JM, Summersgill KF, Klusmann JP, Lee JH, Wang D, et al. Age, sexual behavior and human papillomavirus infection in oral cavity and oropharyngeal cancers. *Int J Cancer*. 2004 Feb 20;108(5):766-72. PMID: 14696105

114. Schwartz SM, Daling JR, Doody DR, Wipf GC, Carter JJ, Madeleine MM, et al. Oral cancer risk in relation to sexual history and evidence of human papillomavirus infection. *J Natl Cancer Inst.* 1998;90(21):1626-36. PMID: 9811312
115. Hansson BG, Rosenquist K, Antonsson A, Wennerberg J, Schildt EB, Bladstrom A, et al. Strong association between infection with human papillomavirus and oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma: a population-based case-control study in southern Sweden. *Acta Otolaryngol.* 2005 Dec;125(12):1337-44. PMID: 16303684
116. Oertel, M., 1895. Das laryngo-stroboskop und die Laryngo-Stro-boskopische Untersuchung. *Archiv Laryngologie Rhinologie.* 3, 1–16.
117. Capítulo 113. Tumores malignos de la laringe. Pérez Ortín, Polo López, Fragola Arnau. Libro virtual SEORL-CCC (www.seorl.net).
118. Porras Alonso E, Anaguary Torres BN, Rodriguez Perez MA. Laryngeal metastases of acral lentiginous melanoma: Narrow band imaging. *Acta Otorrinolaringol Esp.* 2016 Mar-Apr;67(2):120-1. PMID: 25488159
119. Piazza C, Del Bon F, Peretti G, Nicolai P. Narrow band imaging in endoscopic evaluation of the larynx. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg.* 2012;20(6):472-6. PMID: 23000733
120. Shoffel-Havakuk H, Lahav Y, Meidan B, Haimovich Y, Warman M, Hain M, et al. Does narrow band imaging improve preoperative detection of glottic malignancy? A matched comparison study. *Laryngoscope.* 2017 Apr;127(4):894-899. PMID: 27753087
121. Ahuja AT, Ying M, Ho SY, Antonio G, Lee YP, King AD, et al. Ultrasound of malignant cervical lymph nodes. *Cancer Imaging.* 2008;8:48-56. PMID: 18390388
122. Kuribayashi S, Miyashita T, Nakamizo M, Yagi T, Kumita S. Utility of sonography for evaluation of clinical T1 and T2 glottic carcinoma. *J Ultrasound Med.* 2009;28(11):1429-40. PMID: 19854956
123. Kraft M, Mende S, Arnoux A, Arens C. Anatomical landmarks for endosonography of the larynx. *Head Neck.* 2010 Mar;32(3):326-32. PMID: 19626640
124. Tsai CG, Chen JH, Shau YW, Hsiao TY. Dynamic B-mode ultrasound imaging of vocal fold vibration during phonation. *Ultrasound Med Biol.* 2009;35(11):1812-8. PMID: 19716224
125. Yeager VL, Lawson C, Archer CR. Ossification of the laryngeal cartilages as it relates to computed tomography. *Invest Radiol.* 1982;17(1):11-9. PMID: 6804409
126. Becker M. Neoplastic invasion of laryngeal cartilage: radiologic diagnosis and therapeutic implications. *Eur J Radiol.* 2000;33(3):216-29. PMID: 10699738
127. Kuno H, Onaya H, Fujii S, Ojiri H, Otani K, Satake M. Primary staging of laryngeal and hypopharyngeal cancer: CT, MR imaging and dual-energy CT. *Eur J Radiol.* 2014;83(1):e23-35. PMID: 24239239
128. Gordin A, Daitzchman M, Doweck I, Yefremov N, Golz A, Keidar Z, et al. Fluorodeoxyglucose-positron emission tomography/computed tomography imaging in patients with carcinoma of the larynx: diagnostic accuracy and impact on clinical management. *Laryngoscope.* 2006 Feb;116(2):273-8. PMID: 16467718
129. Wang H, Hoda RS, Faquin W, Rossi ED, Hotchandani N, Sun T, et al. FNA biopsy of secondary nonlymphomatous malignancies in salivary glands: A multi-institutional study of 184 cases. *Cancer.* 2017 Feb;125(2):91-103. PMID: 28001329
130. Gonzalez M, Blanc JM, Pardo J, Bosch R, Vinuela JA. [Head and neck fine-needle aspiration: cytohistological correlation]. *Acta Otorrinolaringol Esp.* 2008 May;59(5):205-11. PMID: 18501154
131. Florentine BD, Staymates B, Rabadi M, Sarda N, Barstis J, Black A, et al. Cost savings associated with the use of fine-needle aspiration biopsy (FNAB) for the diagnosis of palpable masses in a community hospital-based FNAB clinic. *Cancer.* 2006;107(9):2270-81. PMID: 17029279
132. Douglas R. Gnepp M. *Diagnostic Surgical Pathology of the Head and Neck (Second Edition)*: Elsevier.
133. Echanique KA, Desai SV, Marchiano E, Spinazzi EF, Strojman P, Baredes S, et al. Laryngeal Verrucous Carcinoma. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2017 Jan;156(1):38-45. PMID: 27484231
134. Fernandez-Acenero MJ, Larach F, Ortega-Fernandez C. Non-epithelial lesions of the larynx: review of the 10-year experience in a tertiary Spanish hospital. *Acta Otolaryngol.* 2009 Jan;129(1):108-12. PMID: 18607979
135. Karatayli-Ozgursoy S, Bishop JA, Hillel AT, Akst LM, Best SR. Non-epithelial tumors of the larynx: a single institution review. *Am J Otolaryngol.* 2016 May-Jun;37(3):279-85. PMID: 27178524
136. Gallo A, Mocetti P, De Vincentiis M, Simonelli M, Ciampini S, Bianco P, et al. Neoplastic infiltration of laryngeal cartilages: histocytochemical study. *Laryngoscope.* 1992 Aug;102(8):891-5. PMID: 1495354
137. Edge SB, Byrd DR, Compton CC, et al., eds.: *AJCC Cancer Staging Manual*. 7th ed. New York, NY: Springer, 2010, pp 57-67.
138. Tomik J, Skladzien J, Modrzejewski M. Evaluation of cervical lymph node metastasis of 1400 patients with cancer of the larynx. *Auris Nasus Larynx.* 2001;28(3):233-40. PMID: 11489367

139. McGavran MH, Bauer WC, Ogura JH. The incidence of cervical lymph node metastases from epidermoid carcinoma of the larynx and their relationship to certain characteristics of the primary tumor. A study based on the clinical and pathological findings for 96 patients treated by primary en bloc laryngectomy and radical neck dissection. *Cancer*. 1961;14:55-66. PMID: 13773928
140. Pinsolle J, Pinsolle V, Majoufre C, Duroux S, Demeaux H, Siberchicot F. Prognostic value of histologic findings in neck dissections for squamous cell carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 1997 Feb;123(2):145-8. PMID: 9046280
141. Leemans CR, Tiwari R, Nauta JJ, van der Waal I, Snow GB. Recurrence at the primary site in head and neck cancer and the significance of neck lymph node metastases as a prognostic factor. *Cancer*. 1994;73(1):187-90. PMID: 8275423
142. Xing Y, Zhang J, Lin H, Gold KA, Sturgis EM, Garden AS, et al. Relation between the level of lymph node metastasis and survival in locally advanced head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer*. 2016;122(4):534-45. PMID: 26554754
143. Levendag P, Sessions R, Vikram B, Strong EW, Shah JP, Spiro R, et al. The problem of neck relapse in early stage supraglottic larynx cancer. *Cancer*. 1989;63(2):345-8. PMID: 2910440
144. Ferlito A, Shaha AR, Silver CE, Rinaldo A, Mondin V. Incidence and sites of distant metastases from head and neck cancer. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec*. 2001;63(4):202-7. PMID: 11408812
145. Ruzevick J, Olivi A, Westra WH. Metastatic squamous cell carcinoma to the brain: an unrecognized pattern of distant spread in patients with HPV-related head and neck cancer. *J Neurooncol*. 2013 May;112(3):449-54. PMID: 23408186
146. Neumann E. Secondare cancrroid-Infiltration des nervus mentalis bei einem Fall von Lippencancroid. *Virchows Arch*. 1862;24:201.
147. Shattock SG. Invasion of the Nerves in Carcinoma of the Sublingual Salivary Gland, associated with Carcinoma of the Tongue. *Proc R Soc Med*. 1922;15(Pathol Sect):13-6. PMID: 19982483
148. Bulut OC, Lindel K, Hauswald H, Brandt R, Klauschen F, Wolf J, et al. Clinical and molecular characteristics of HNSCC patients with brain metastases: a retrospective study. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2014 Jun;271(6):1715-22. PMID: 23990032
149. Muller S, Khuri FR, Kono SA, Beitler JJ, Shin DM, Saba NF. HPV positive squamous cell carcinoma of the oropharynx. Are we observing an unusual pattern of metastases? *Head Neck Pathol*. 2012 Sep;6(3):336-44. PMID: 22528827
150. Warren S, Gates O. Multiple malignant tumor: A survey of the literature and statistical study. *Am J Cancer*. 1932;51:1358-414.
151. Morris LG, Sikora AG, Patel SG, Hayes RB, Ganly I. Second primary cancers after an index head and neck cancer: subsite-specific trends in the era of human papillomavirus-associated oropharyngeal cancer. *J Clin Oncol*. 2011;29(6):739-46. PMID: 21189382
152. Morris LG, Sikora AG, Hayes RB, Patel SG, Ganly I. Anatomic sites at elevated risk of second primary cancer after an index head and neck cancer. *Cancer Causes Control*. 2011;22(5):671-9. PMID: 21327458
153. Chuang SC, Scelo G, Tonita JM, Tamaro S, Jonasson JG, Kliever EV, et al. Risk of second primary cancer among patients with head and neck cancers: A pooled analysis of 13 cancer registries. *Int J Cancer*. 2008 Nov 15;123(10):2390-6. PMID: 18729183
154. Priante AV, Castilho EC, Kowalski LP. Second primary tumors in patients with head and neck cancer. *Curr Oncol Rep*. 2011;13(2):132-7. PMID: 21234721
155. Denoix PF. Tumor, Node and Metastasis TNM). *Bull Inst Nat Hyg (Paris)* 1944;1:1-69.
156. Robbins KT, Medina JE, Wolfe GT, Levine PA, Sessions RB, Pruet CW. Standardizing neck dissection terminology. Official report of the Academy's Committee for Head and Neck Surgery and Oncology. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 1991 Jun;117(6):601-5. PMID: 2036180
157. Department of Veterans Affairs Laryngeal Cancer Study Group, Wolf GT, Fisher SG, Hong WK, Hillman R, Spaulding M, Laramore GE, Endicott JW, McClatchey K, Henderson WG. Induction chemotherapy plus radiation compared with surgery plus radiation in patients with advanced laryngeal cancer. The Department of Veterans Affairs Laryngeal Cancer Study Group. *N Engl J Med*. 1991 Jun 13;324(24):1685-90. PMID: 2034244
158. Hoffman HT, Porter K, Karnell LH, Cooper JS, Weber RS, Langer CJ, et al. Laryngeal cancer in the United States: changes in demographics, patterns of care, and survival. *Laryngoscope*. 2006 Sep;116(9 Pt 2 Suppl 111):1-13. PMID: 16946667
159. Jemal A, Tiwari RC, Murray T, Ghafoor A, Samuels A, Ward E, et al. Cancer statistics, 2004. *CA Cancer J Clin*. 2004 Jan-Feb;54(1):8-29. PMID: 14974761
160. Rodrigo JP, Coca-Pelaz A, Suárez C. El papel actual de la cirugía parcial como estrategia de preservación funcional en el carcinoma de laringe. *Acta Otorrinolaringol Esp* 2011;62:231-8. PMID: 20684940

161. Remacle M, Eckel HE, Antonelli A, Brasnu D, Chevalier D, Friedrich G, et al. Endoscopic cordectomy. A proposal for a classification by the Working Committee, European Laryngological Society. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2000;257(4):227-31. PMID: 10867840
162. Hinni ML, Salassa JR, Grant DG, Pearson BW, Hayden RE, Martin A, et al. Transoral laser microsurgery for advanced laryngeal cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2007 Dec;133(12):1198-204. PMID: 18086960
163. Rudert HH, Werner JA, Hoft S. Transoral carbon dioxide laser resection of supraglottic carcinoma. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 1999;108(9):819-27. PMID: 10527270
164. Blanch JL, Vilaseca I, Bernal-Sprekelsen M, Grau JJ, Moragas M, Traserra-Coderch J, et al. Prognostic significance of surgical margins in transoral CO2 laser microsurgery for T1-T4 pharyngo-laryngeal cancers. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2007 Sep;264(9):1045-51. PMID: 17479274
165. Peretti G, Piazza C, Cattaneo A, De Benedetto L, Martin E, Nicolai P. Comparison of functional outcomes after endoscopic versus open-neck supraglottic laryngectomies. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 2006;115(11):827-32. PMID: 17165665
166. Smith RV. Transoral robotic surgery for larynx cancer. *Otolaryngol Clin North Am.* 2014 Jun;47(3):379-95. PMID: 24882796
167. Wang CC, Liu SA, Wu SH, Lin WJ, Jiang RS, Wang L. Transoral robotic surgery for early glottic carcinoma involving anterior commissure: Preliminary reports. *Head Neck.* 2016 Jun;38(6):913-8. PMID: 26714200
168. Johnson JT, Myers EN, Hao SP, Wagner RL. Outcome of open surgical therapy for glottic carcinoma. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 1993;102(10):752-5. PMID: 8215093
169. Brumund KT, Gutierrez-Fonseca R, Garcia D, Babin E, Hans S, Laccourreye O. Frontolateral vertical partial laryngectomy without tracheotomy for invasive squamous cell carcinoma of the true vocal cord: a 25-year experience. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 2005;114(4):314-22. PMID: 15895788
170. Kessler DJ, Trapp TK, Calcaterra TC. The treatment of T3 glottic carcinoma with vertical partial laryngectomy. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 1987 Nov;113(11):1196-9. PMID: 3663347
171. Karatzanis AD, Psychogios G, Zenk J, Waldfahrer F, Hornung J, Velegrakis GA, et al. Comparison among different available surgical approaches in T1 glottic cancer. *Laryngoscope.* 2009 Sep;119(9):1704-8. PMID: 19572396
172. Alonso JM. Conservative surgery of cancer of the larynx. *Trans Am Acad Ophthalmol Otolaryngol.* 1947;51:633-42. PMID: 20258270
173. Ogura JH. Supraglottic subtotal laryngectomy and radical neck dissection for carcinoma of the epiglottis. *T Laryngoscope.* 1958 Jun;68(6):983-1003. PMID: 13564831
174. Sevilla MA, Rodrigo JP, Llorente JL, Cabanillas R, Lopez F, Suarez C. Supraglottic laryngectomy: analysis of 267 cases. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2008 Jan;265(1):11-6. PMID: 17684753
175. Herranz J, Martinez Vidal J, Martinez Moran A. [Supraglottic laryngectomy. Still on-going]. *Acta Otorrinolaringol Esp.* 2006 May;57(5):235-41. PMID: 1676820
176. Sessions DG, Lenox J, Spector GJ. Supraglottic laryngeal cancer: analysis of treatment results. *Laryngoscope.* 2005 Aug;115(8):1402-10. PMID: 16094113
177. H. Majer, A. Rieder. Technique de laryngectomie permettant de conserver la perméabilité respiratoire: la crico-hyoidopexie. *Ann Otolaryngol Chir Cervicofac,* 76 (1959), pp. 677-683.
178. Schwaab G, Kolb F, Julieron M, Janot F, Le Ridant AM, Mamelle G, et al. Subtotal laryngectomy with cricohyoidopexy as first treatment procedure for supraglottic carcinoma: Institut Gustave-Roussy experience (146 cases, 1974-1997). *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2001 Jul;258(5):246-9. PMID: 11548904
179. Laccourreye O, Brasnu D, Perie S, Muscatello L, Menard M, Weinstein G. Supracricoid partial laryngectomies in the elderly: mortality, complications, and functional outcome. *Laryngoscope.* 1998 Feb;108(2):237-42. PMID: 9473075
180. Laccourreye O, Crevier-Buchmann L, Weinstein G, Biacabe B, Laccourreye H, Brasnu D. Duration and frequency characteristics of speech and voice following supracricoid partial laryngectomy. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 1995;104(7):516-21. PMID: 7598362
181. Naudo P, Laccourreye O, Weinstein G, Hans S, Laccourreye H, Brasnu D. Functional outcome and prognosis factors after supracricoid partial laryngectomy with cricohyoidopexy. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 1997;106(4):291-6. PMID: 9109718
182. de Paula Vernetta, C.; de la Fuente Arjona, L.; García Callejo, F. J.; Ramírez Sabio, J. B.; Marco Algarra, J. Laringuectomía casi total. Experiencia, complicaciones y análisis de voz. *Acta Otorrinolaringol Esp* 2005; 56: 423-427. PMID: 16353789
183. Gavilan J, Herranz J, Prim J, Rabanal I. Speech results and complications of near-total laryngectomy. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 1996;105(9):729-33. PMID: 8800061
184. D'Cruz AK, Sharma S, Pai PS. Current status of near-total laryngectomy: review. *J Laryngol Otol.* 2012 Jun;126(6):556-62. PMID: 22494392

185. Ceachir O, Hainarosie R, Zainea V. Total laryngectomy - past, present, future. *Maedica (Buchar)*. 2014 Jun;9(2):210-6. PMID: 25705281
186. Kierzek A, Paprocka-Borowicz M, Pozowski A, Kuciel-Lewandowska J. The first Polish total laryngectomies. *Contemp Oncol (Pozn)*. 2013;17(6):473-6. PMID: 24592132
187. Folz BJ, Silver CE, Rinaldo A, Ferlito A. Themistocles Gluck: biographic remarks emphasising his contributions to laryngectomy. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2011 Aug;268(8):1175-1179. PMID: 21499872
188. Ogura JH, Bello JA. Laryngectomy and radical neck dissection for carcinoma of the larynx. *Laryngoscope*. 1952 Jan;62(1):1-52. PMID: 14909545
189. Lorenz KJ, Hilgers FM, Maier H. [A novel puncture instrument: the Provox-Vega(R) puncture set. Its use in voice prosthesis insertion following laryngectomy]. *HNO*. 2013;61(1):30-7. PMID: 22767197
190. Hasan Z, Dwivedi RC, Gunaratne DA, Virk SA, Palme CE, Riffat F. Systematic review and meta-analysis of the complications of salvage total laryngectomy. *Eur J Surg Oncol*. 2017;43(1):42-51. PMID: 27265037
191. J.J. Álvarez Vicent. Laryngectomie fonctionnelle selon la technique de l'évidement sous-périchondral du larynx. *Ann. Oto-Laryng.* (Paris), 1975, t. 92, n° 1-2 (pp. 61-72).
192. Zanaret M., Paris J., Duflo S. Évidements ganglionnaires Cervicaux. *EMC (Elsevier SAS, Paris), Techniques chirurgicales - Tête et cou*, 46-470, 2005.
193. Ferlito A, Robbins KT, Rinaldo A. Neck Dissection: historical perspective. *J Laryngol Otol* 2004;118:403-5. PMID: 15285853
194. Siegel R, Ma J, Zou Z, Jemal A. Cancer statistics, 2014. *CA Cancer J Clin*. 2014 Jan-Feb;64(1):9-29. PMID: 24399786
195. Sturgis EM, Cinciripini PM. Trends in head and neck cancer incidence in relation to smoking prevalence: an emerging epidemic of human papillomavirus-associated cancers? *Cancer*. 2007;110(7):1429-35. PMID: 17724670
196. Marur S, Forastiere AA. Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: Update on Epidemiology, Diagnosis, and Treatment. *Mayo Clin Proc*. 2016;91(3):386-96. PMID: 26944243
197. Langendijk JA, Doornaert P, Verdonck-de Leeuw IM, Leemans CR, Aaronson NK, Slotman BJ. Impact of late treatment-related toxicity on quality of life among patients with head and neck cancer treated with radiotherapy. *J Clin Oncol*. 2008;26(22):3770-6. PMID: 18669465
198. Posner MR, Hershock DM, Blajman CR, Mickiewicz E, Winkquist E, Gorbounova V, et al. Cisplatin and fluorouracil alone or with docetaxel in head and neck cancer. *N Engl J Med*. 2007 Oct 25;357(17):1705-15. PMID: 17960013
199. Blanchard P, Bourhis J, Lacas B, et al; Meta-Analysis of Chemotherapy in Head and Neck Cancer, Induction Project, Collaborative Group. Taxane-cisplatin-fluorouracil as induction chemotherapy in locally advanced head and neck cancers: an individual patient data meta-analysis of the Meta-Analysis of Chemotherapy in Head and Neck Cancer Group. *J Clin Oncol*. 2013;31(23):2854-2860. PMID: 23835714
200. Ferlito A, Haigentz M, Jr., Bradley PJ, Suarez C, Strojjan P, Wolf GT, et al. Causes of death of patients with laryngeal cancer. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2014 Mar;271(3):425-34. PMID: 23591796
201. Mortuaire G, Francois J, Wiel E, Chevalier D. Local recurrence after CO2 laser cordectomy for early glottic carcinoma. *Laryngoscope*. 2006 Jan;116(1):101-5. PMID: 16481819
202. Hinerman RW, Mendenhall WM, Morris CG, Amdur RJ, Werning JW, Villaret DB. T3 and T4 true vocal cord squamous carcinomas treated with external beam irradiation: a single institution's 35-year experience. *Am J Clin Oncol*. 2007 Apr;30(2):181-5. PMID: 17414468
203. Lassaletta L, Garcia-Pallares M, Morera E, Bernaldez R, Gavilan J. T3 glottic cancer: oncologic results and prognostic factors. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2001 May;124(5):556-60. PMID: 11337662
204. Spector GJ, Sessions DG, Lenox J, Newland D, Simpson J, Haughey BH. Management of stage IV glottic carcinoma: therapeutic outcomes. *Laryngoscope*. 2004 Aug;114(8):1438-46. PMID: 15280724
205. Canis M, Ihler F, Martin A, Wolff HA, Matthias C, Steiner W. Results of 226 patients with T3 laryngeal carcinoma after treatment with transoral laser microsurgery. *Head Neck*. 2014 May;36(5):652-9. PMID: 23596018
206. Li P, Hu W, Zhu Y, Liu J. Treatment and predictive factors in patients with recurrent laryngeal carcinoma: A retrospective study. *Oncol Lett*. 2015;10(5):3145-52. PMID: 26722302
207. Trus BL, Roden RB, Greenstone HL, Vrhel M, Schiller JT, Booy FP. Novel structural features of bovine papillomavirus capsid revealed by a three-dimensional reconstruction to 9 Å resolution. *Nat Struct Biol*. 1997;4(5):413-20. PMID: 9145113
208. Munoz N, Castellsague X, de Gonzalez AB, Gissmann L. Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine*. 2006;24 Suppl 3:S3/1-10.

209. Hartwig S, Syrjanen S, Dominiak-Felden G, Brotons M, Castellsague X. Estimation of the epidemiological burden of human papillomavirus-related cancers and non-malignant diseases in men in Europe: a review. *BMC Cancer*. 2012;12:30. PMID: 22260541
210. Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Herrero R, Castellsague X, Shah KV, et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *The New England journal of medicine*. 2003;348(6):518-27. PMID: 12571259
211. Dunne EF, Unger ER, Sternberg M, McQuillan G, Swan DC, Patel SS, et al. Prevalence of HPV infection among females in the United States. *JAMA*. 2007;297(8):813-9. PMID: 17327523
212. Giuliano AR, Lee JH, Fulp W, Villa LL, Lazcano E, Papenfuss MR, et al. Incidence and clearance of genital human papillomavirus infection in men (HIM): a cohort study. *Lancet*. 2011;377(9769):932-40. PMID: 21367446
213. Gillison ML, Broutian T, Pickard RK, Tong ZY, Xiao W, Kahle L, et al. Prevalence of oral HPV infection in the United States, 2009-2010. *JAMA*. 2012;307(7):693-703. PMID: 22282321
214. Bruni L, Barrionuevo-Rosas L, Albero G, Aldea M, Serrano B, Valencia D, Brotons M, Mena M, Cosano R, Muñoz J, Bosch FX, de San José S, Castellsagué X. ICO Information Centre on HPV and Cancer (HPV Information Centre). Human Papillomavirus and Related Diseases in Spain. Summary Report 2016-02-26. Disponible en: <http://www.hpvcentre.net/statistics/reports/ESP.pdf>.
215. Bonagura VR, Hatam LJ, Rosenthal DW, de Voti JA, Lam F, Steinberg BM, et al. Recurrent respiratory papillomatosis: a complex defect in immune responsiveness to human papillomavirus-6 and -11. *APMIS*. 2010;118(6-7):455-70. PMID: 20553528
216. Schiffman M, Kjaer SK. Chapter 2: Natural history of anogenital human papillomavirus infection and neoplasia. *J Natl Cancer Inst Monogr*. 2003(31):14-9. PMID: 12807940
217. Trottier H, Franco EL. The epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Vaccine*. 2006;24 Suppl 1:S1-15. PMID: 16406226
218. Bourgault Villada I, Moyal Barracco M, Ziol M, Chaboissier A, Barget N, Berville S, et al. Spontaneous regression of grade 3 vulvar intraepithelial neoplasia associated with human papillomavirus-16-specific CD4(+) and CD8(+) T-cell responses. *Cancer Res*. 2004;64(23):8761-6. PMID: 15574788
219. Paternoster DM, Cester M, Resente C, Pascoli I, Nanhornue K, Marchini F, et al. Human papilloma virus infection and cervical intraepithelial neoplasia in transplanted patients. *Transplant Proc*. 2008;40(6):1877-80. PMID: 18675077
220. D'Souza G, Fakhry C, Sugar EA, Seaberg EC, Weber K, Minkoff HL, et al. Six-month natural history of oral versus cervical human papillomavirus infection. *Int J Cancer*. 2007 Jul 1;121(1):143-50. PMID: 17354235
221. Castle PE, Schiffman M, Herrero R, Hildesheim A, Rodriguez AC, Bratti MC, et al. A prospective study of age trends in cervical human papillomavirus acquisition and persistence in Guanacaste, Costa Rica. *J Infect Dis*. 2005 Jun 1;191(11):1808-16
222. Best SR, Peng S, Juang CM, Hung CF, Hannaman D, Saunders JR, et al. Administration of HPV DNA vaccine via electroporation elicits the strongest CD8+ T cell immune responses compared to intramuscular injection and intradermal gene gun delivery. *Vaccine*. 2009;27(40):5450-9. PMID: 19622402
223. Frazer IH. Interaction of human papillomaviruses with the host immune system: a well evolved relationship. *Virology*. 2009;384(2):410-4. PMID: 18986661
224. Carter JJ, Koutsky LA, Hughes JP, Lee SK, Kuypers J, Kiviat N, et al. Comparison of human papillomavirus types 16, 18, and 6 capsid antibody responses following incident infection. *J Infect Dis*. 2000 Jun;181(6):1911-9. PMID: 10837170
225. Carter JJ, Madeleine MM, Shera K, Schwartz SM, Cushing-Haugen KL, Wipf GC, et al. Human papillomavirus 16 and 18 L1 serology compared across anogenital cancer sites. *Cancer Res*. 2001;61(5):1934-40. PMID: 11280749
226. Anderson KS, Gerber JE, D'Souza G, Pai SI, Cheng JN, Alam R, et al. Biologic predictors of serologic responses to HPV in oropharyngeal cancer: The HOTSPOT study. *Oral Oncol*. 2015;51(8):751-8. PMID: 26094591
227. Kreimer AR, Johansson M, Waterboer T, Kaaks R, Chang-Claude J, Drogen D, et al. Evaluation of human papillomavirus antibodies and risk of subsequent head and neck cancer. *J Clin Oncol*. 2013;31(21):2708-15. PMID: 23775966
228. Welters MJ, de Jong A, van den Eeden SJ, van der Hulst JM, Kwappenberg KM, Hassane S, et al. Frequent display of human papillomavirus type 16 E6-specific memory t-Helper cells in the healthy population as witness of previous viral encounter. *Cancer Res*. 2003;63(3):636-41. PMID: 12566307
229. Westrich JA, Warren CJ, Pyeon D. Evasion of host immune defenses by human papillomavirus. *Virus Res*. 2017 Mar 2;231:21-33. PMID: 27890631
230. Ashrafi GH, Haghshenas MR, Marchetti B, O'Brien PM, Campo MS. E5 protein of human papillomavirus type 16 selectively downregulates surface HLA class I. *Int J Cancer*. 2005 Jan 10;113(2):276-83. PMID: 15386416
231. Stanley MA, Pett MR, Coleman N. HPV: from infection to cancer. *Biochem Soc Trans*. 2007 Dec;35(Pt 6):1456-60. PMID: 18031245

232. Best SR, Niparko KJ, Pai SI. Biology of human papillomavirus infection and immune therapy for HPV-related head and neck cancers. *Otolaryngol Clin North Am*. 2012 Aug;45(4):807-22. PMID: 22793854
233. Munger K, Baldwin A, Edwards KM, Hayakawa H, Nguyen CL, Owens M, et al. Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis. *J Virol*. 2004;78(21):11451-60.
234. Rampias T, Sasaki C, Weinberger P, Psyrris A. E6 and e7 gene silencing and transformed phenotype of human papillomavirus 16-positive oropharyngeal cancer cells. *J Natl Cancer Inst*. 2009;101(6):412-23.
235. Funk JO, Waga S, Harry JB, Espling E, Stillman B, Galloway DA. Inhibition of CDK activity and PCNA-dependent DNA replication by p21 is blocked by interaction with the HPV-16 E7 oncoprotein. *Genes Dev*. 1997;11(16):2090-100.
236. Kim WY, Sharpless NE. The regulation of INK4/ARF in cancer and aging. *Cell*. 2006;127(2):265-75.
237. Strati K, Lambert PF. Role of Rb-dependent and Rb-independent functions of papillomavirus E7 oncogene in head and neck cancer. *Cancer Res*. 2007;67(24):11585-93.
238. Agoff SN, Lin P, Morihara J, Mao C, Kiviat NB, Koutsky LA. p16(INK4a) expression correlates with degree of cervical neoplasia: a comparison with Ki-67 expression and detection of high-risk HPV types. *Mod Pathol*. 2003;16(7):665-73.
239. Begum S, Gillison ML, Ansari-Lari MA, Shah K, Westra WH. Detection of human papillomavirus in cervical lymph nodes: a highly effective strategy for localizing site of tumor origin. *Clin Cancer Res*. 2003 Dec 15;9(17):6469-75. PMID: 14695150
240. Cancer Genome Atlas N. Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas. *Nature*. 2015;517(7536):576-82.
241. Seiwerth TY, Zuo Z, Keck MK, Khattri A, Pedomallu CS, Stricker T, et al. Integrative and comparative genomic analysis of HPV-positive and HPV-negative head and neck squamous cell carcinomas. *Clin Cancer Res*. 2015 Feb 1;21(3):632-41. PMID: 25056374
242. Westra WH. Detection of human papillomavirus in clinical samples. *Otolaryngol Clin North Am*. 2012 Aug;45(4):765-77. PMID: 22793851
243. Syrjänen S. Human papillomavirus (HPV) in head and neck cancer. *J Clin Virol*. 2005;32 Suppl 1:S59-66.
244. Singhi AD, Westra WH. Comparison of human papillomavirus in situ hybridization and p16 immunohistochemistry in the detection of human papillomavirus-associated head and neck cancer based on a prospective clinical experience. *Cancer*. 2010;116(9):2166-73.
245. Abreu AL, Souza RP, Gimenes F, Consolaro ME. A review of methods for detect human Papillomavirus infection. *Virol J*. 2012;9:262. PMID: 23131123
246. Sedghizadeh PP, Billington WD, Paxton D, Ebeed R, Mahabady S, Clark GT, et al. Is p16-positive oropharyngeal squamous cell carcinoma associated with favorable prognosis? A systematic review and meta-analysis. *Oral Oncol*. 2016;54:15-27.
247. Lewis JS, Jr., Chernock RD, Ma XJ, Flanagan JJ, Luo Y, Gao G, et al. Partial p16 staining in oropharyngeal squamous cell carcinoma: extent and pattern correlate with human papillomavirus RNA status. *Mod Pathol*. 2012;25(9):1212-20.
248. Burd EM. Human Papillomavirus Laboratory Testing: the Changing Paradigm. *Clin Microbiol Rev*. 2016;29(2):291-319.
249. Chuang AY, Chuang TC, Chang S, Zhou S, Begum S, Westra WH, et al. Presence of HPV DNA in convalescent salivary rinses is an adverse prognostic marker in head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncol*. 2008;44(10):915-9.
250. de Villiers EM, Weidauer H, Otto H, zur Hausen H. Papillomavirus DNA in human tongue carcinomas. *Int J Cancer*. 1985 Nov 15;36(5):575-8. PMID: 2997044
251. Zhang M, Kumar B, Piao L, Xie X, Schmitt A, Arradaza N, et al. Elevated intrinsic cancer stem cell population in human papillomavirus-associated head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer*. 2014;120(7):992-1001.
252. Ukpo OC, Flanagan JJ, Ma XJ, Luo Y, Thorstad WL, Lewis JS, Jr. High-risk human papillomavirus E6/E7 mRNA detection by a novel in situ hybridization assay strongly correlates with p16 expression and patient outcomes in oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Am J Surg Pathol*. 2011;35(9):1343-50.
253. Kim MJ, Ki MS, Kim K, Shim HJ, Hwang JE, Bae WK, et al. Different protein expression associated with chemotherapy response in oropharyngeal cancer according to HPV status. *BMC Cancer*. 2014;14:824.
254. Yildirim S, Cermik H, Isitmangil T, Baloglu H, Gungor A, Pekkaflali Z. Significance of p53 and bcl-2 immunoexpression in the prognosis of laryngeal squamous cell carcinoma. *J Int Med Res*. 2002;30(6):597-600.
255. Nakano T, Yamamoto H, Nakashima T, Nishijima T, Satoh M, Hatanaka Y, et al. Molecular subclassification determined by human papillomavirus and epidermal growth factor receptor status is associated with the prognosis of oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Hum Pathol*. 2016;50:51-61.
256. NCI. Clinical Trial NCT01084083 - Paclitaxel, cisplatin, and cetuximab followed by cetuximab and intensity-modulated radiation therapy in treating patients with HPV-associated stage III or stage IV cancer of the oropharynx that can be removed by surgery. Disponible en: <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01084083>.
257. Kumar B, Yadav A, Brown NV, Zhao S, Cipolla MJ, Wakely PE, et al. Nuclear PRMT5, cyclin D1 and IL-6 are associated with poor outcome in oropharyngeal squamous cell carcinoma patients and is inversely associated with p16-status. *Oncotarget*. 2017 Feb 28;8(9):14847-14859. PMID: 28107179

258. Anderson KS, Dahlstrom KR, Cheng JN, Alam R, Li G, Wei Q, et al. HPV16 antibodies as risk factors for oropharyngeal cancer and their association with tumor HPV and smoking status. *Oral Oncol.* 2015;51(7):662-7.
259. D'Souza G, Gross ND, Pai SI, Haddad R, Anderson KS, Rajan S, et al. Oral human papillomavirus (HPV) infection in HPV-positive patients with oropharyngeal cancer and their partners. *J Clin Oncol.* 2014;32(23):2408-15.
260. Zhang Y, Waterboer T, Pawlita M, Sugar E, Minkoff H, Cranston RD, et al. Human Papillomavirus (HPV) 16 E6 seropositivity is elevated in subjects with oral HPV16 infection. *Cancer Epidemiol.* 2016;43:30-4.
261. T. Waterboer, K.A.L. Kuhs, A.R. Kreimer, S.P. Gibson, N.C. Schmitt, S. Trivedi, et al., Sensitivity and specificity of HPV16 serology for HPV-driven oropharyngeal cancer, *Int. Papillomavirus Conf. Lisbon (2015)* page 110.
262. Herrero R, Castellsague X, Pawlita M, Lissowska J, Kee F, Balaram P, et al. Human papillomavirus and oral cancer: the International Agency for Research on Cancer multicenter study. *J Natl Cancer Inst.* 2003;95(23):1772-83.
263. Furniss CS, McClean MD, Smith JF, Bryan J, Nelson HH, Peters ES, et al. Human papillomavirus 16 and head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Cancer.* 2007 Jun 1;120(11):2386-92. PMID: 17315185
264. Pintos J, Black MJ, Sadeghi N, Ghadirian P, Zeitouni AG, Viscidi RP, et al. Human papillomavirus infection and oral cancer: a case-control study in Montreal, Canada. *Oral Oncol.* 2008;44(3):242-50.
265. Schwartz SR, Yueh B, McDougall JK, Daling JR, Schwartz SM. Human papillomavirus infection and survival in oral squamous cell cancer: a population-based study. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2001 Jul;125(1):1-9. PMID: 11458206
266. Sitas F, Urban M, Stein L, Beral V, Ruff P, Hale M, et al. The relationship between anti-HPV-16 IgG seropositivity and cancer of the cervix, anogenital organs, oral cavity and pharynx, oesophagus and prostate in a black South African population. *Infect Agent Cancer.* 2007;2:6.
267. Tindle RW. Immune evasion in human papillomavirus-associated cervical cancer. *Nat Rev Cancer.* 2002;2(1):59-65.
268. Syrjanen K, Syrjanen S, Lamberg M, Pyrhonen S, Nuutinen J. Morphological and immunohistochemical evidence suggesting human papillomavirus (HPV) involvement in oral squamous cell carcinogenesis. *Int J Oral Surg.* 1983;12(6):418-24.
269. Weinberger PM, Yu Z, Haffty BG, Kowalski D, Harigopal M, Brandsma J, et al. Molecular classification identifies a subset of human papillomavirus--associated oropharyngeal cancers with favorable prognosis. *J Clin Oncol.* 2006;24(5):736-47.
270. Licitra L, Zigon G, Gatta G, Sanchez MJ, Berrino F, Group EW. Human papillomavirus in HNSCC: a European epidemiologic perspective. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2008;22(6):1143-53, VII-VIII.
271. Mehanna H, Beech T, Nicholson T, El-Hariry I, McConkey C, Paleri V, et al. Prevalence of human papillomavirus in oropharyngeal and nonoropharyngeal head and neck cancer--systematic review and meta-analysis of trends by time and region. *Head Neck.* 2013 May;35(5):747-55. PMID: 22267298
272. Braakhuis BJ, Snijders PJ, Keune WJ, Meijer CJ, Ruijter-Schippers HJ, Leemans CR, et al. Genetic patterns in head and neck cancers that contain or lack transcriptionally active human papillomavirus. *J Natl Cancer Inst.* 2004;96(13):998-1006.
273. Abogunrin S, Di Tanna GL, Keeping S, Carroll S, Iheanacho I. Prevalence of human papillomavirus in head and neck cancers in European populations: a meta-analysis. *BMC Cancer.* 2014;14:968.
274. Castellsagué X, Alemany L, Holzinger D, et al, on behalf of the ICO Head and Neck Cancer Study group. Estimation of the HPV etiological fraction in over 4000 head and neck cancers worldwide. 29th International Papillomavirus Conference; Seattle, WA, USA; Aug 1–25, 2014. Oral poster session PH.PD03.01.
275. Sand L, Jalouli J, Larsson PA, Hirsch JM. Human papilloma viruses in oral lesions. *Anticancer Res.* 2000;20(2B):1183-8.
276. Baumann JL, Cohen S, Evjen AN, Law JH, Vadivelu S, Attia A, et al. Human papillomavirus in early laryngeal carcinoma. *Laryngoscope.* 2009 Aug;119(8):1531-7. PMID: 19489068
277. Li N, Franceschi S, Howell-Jones R, Snijders PJ, Clifford GM. Human papillomavirus type distribution in 30,848 invasive cervical cancers worldwide: Variation by geographical region, histological type and year of publication. *Int J Cancer.* 2011 Feb 15;128(4):927-35. PMID: 20473886
278. Hutcheson KA, Holsinger FC, Kupferman ME, Lewin JS. Functional outcomes after TORS for oropharyngeal cancer: a systematic review. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2015 Feb;272(2):463-71. PMID: 24643851
279. D'Souza G, Westra WH, Wang SJ, van Zante A, Wentz A, Kluz N, et al. Differences in the Prevalence of Human Papillomavirus (HPV) in Head and Neck Squamous Cell Cancers by Sex, Race, Anatomic Tumor Site, and HPV Detection Method. *JAMA Oncol.* 2016.
280. Jemal A, Simard EP, Dorell C, Noone AM, Markowitz LE, Kohler B, et al. Annual Report to the Nation on the Status of Cancer, 1975-2009, featuring the burden and trends in human papillomavirus(HPV)-associated cancers and HPV vaccination coverage levels. *J Natl Cancer Inst.* 2013;105(3):175-201.
281. Castellsague X, Alemany L, Quer M, Halc G, Quiros B, Tous S, et al. HPV Involvement in Head and Neck Cancers: Comprehensive Assessment of Biomarkers in 3680 Patients. *J Natl Cancer Inst.* 2016;108(6):djv403.

282. Worsham MJ, Stephen JK, Chen KM, Mahan M, Schweitzer V, Havard S, et al. Improved survival with HPV among African Americans with oropharyngeal cancer. *Clin Cancer Res*. 2013 May 1;19(9):2486-92. PMID: 23532894
283. Settle K, Posner MR, Schumaker LM, Tan M, Suntharalingam M, Goloubeva O, et al. Racial survival disparity in head and neck cancer results from low prevalence of human papillomavirus infection in black oropharyngeal cancer patients. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2009;2(9):776-81. PMID: 19641042
284. Schrank TP, Han Y, Weiss H, Resto VA. Case-matching analysis of head and neck squamous cell carcinoma in racial and ethnic minorities in the United States--possible role for human papillomavirus in survival disparities. *Head Neck*. 2011 Jan;33(1):45-53. PMID: 20848419
285. Rose Ragin CC, Taioli E. Second primary head and neck tumor risk in patients with cervical cancer--SEER data analysis. *Head Neck*. 2008 Jan;30(1):58-66. PMID: 17657793
286. Sinha P, Logan HL, Mendenhall WM. Human papillomavirus, smoking, and head and neck cancer. *American journal of otolaryngology*. 2012;33(1):130-6. *Am J Otolaryngol*. 2012 Jan-Feb;33(1):130-6.
287. Kanodia S, Fahey LM, Kast WM. Mechanisms used by human papillomaviruses to escape the host immune response. *Curr Cancer Drug Targets*. 2007;7(1):79-89.
288. Giuliano AR, Sedjo RL, Roe DJ, Harri R, Baldwi S, Papenfuss MR, et al. Clearance of oncogenic human papillomavirus (HPV) infection: effect of smoking (United States). *Cancer Causes Control*. 2002;13(9):839-46.
289. Torre V, Bucolo S, Giordano C, Ciciarello R, Cavallari V, Garofalo L, et al. Palatine tonsils in smoker and non-smoker patients: a pilot clinicopathological and ultrastructural study. *J Oral Pathol Med*. 2005;34(7):390-6.
290. Xi LF, Koutsky LA, Castle PE, Edelstein ZR, Meyers C, Ho J, et al. Relationship between cigarette smoking and human papilloma virus types 16 and 18 DNA load. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2009 Dec;18(12):3490-6. PMID: 19959700
291. Castellsague X, Munoz N. Chapter 3: cofactors in human papillomavirus carcinogenesis: role of parity, oral contraceptives, and tobacco smoking. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2003:20-8.
292. Maxwell JH, Kumar B, Feng FY, Worden FP, Lee JS, Eisbruch A, et al. Tobacco use in human papillomavirus-positive advanced oropharynx cancer patients related to increased risk of distant metastases and tumor recurrence. *Clin Cancer Res*. 2010 Feb 15;16(4):1226-35. PMID: 20145161
293. Gillison ML, Harris J, Westra W, et al. Survival outcomes by tumor human papillomavirus (HPV) status in stage III-IV oropharyngeal cancer (OPC) in RTOG 0129. *J Clin Oncol* 2009;27.
294. Kohler BA, Ward E, McCarthy BJ, Schymura MJ, Ries LA, Ehemann C, et al. Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2007, featuring tumors of the brain and other nervous system. *J Natl Cancer Inst*. 2011;103(9):714-36.
295. Wu Y, Posner MR, Schumaker LM, Nikitakis N, Goloubeva O, Tan M, et al. Novel biomarker panel predicts prognosis in human papillomavirus-negative oropharyngeal cancer: an analysis of the TAX 324 trial. *Cancer*. 2012;118(7):1811-7.
296. Thariat J, Badoual C, Faure C, Butori C, Marcy PY, Righini CA. Basaloid squamous cell carcinoma of the head and neck: role of HPV and implication in treatment and prognosis. *J Clin Pathol*. 2010;63(10):857-66.
297. Torrente MC, Rodrigo JP, Haigentz M, Jr., Dikkers FG, Rinaldo A, Takes RP, et al. Human papillomavirus infections in laryngeal cancer. *Head Neck*. 2011 Apr;33(4):581-6. PMID: 20848441
298. Patel KR, Chernock RD, Zhang TR, Wang X, El-Mofty SK, Lewis JS, Jr. Verrucous carcinomas of the head and neck, including those with associated squamous cell carcinoma, lack transcriptionally active high-risk human papillomavirus. *Hum Pathol*. 2013;44(11):2385-92.
299. Odar K, Kocjan BJ, Hosnjak L, Gale N, Poljak M, Zidar N. Verrucous carcinoma of the head and neck - not a human papillomavirus-related tumour? *J Cell Mol Med*. 2014;18(4):635-45.
300. Fleming DT, McQuillan GM, Johnson RE, Nahmias AJ, Aral SO, Lee FK, et al. Herpes simplex virus type 2 in the United States, 1976 to 1994. *N Engl J Med*. 1997 Oct 16;337(16):1105-11. PMID: 9329932
301. Saulle R, Semyonov L, Mannocci A, Careri A, Saburri F, Ottolenghi L, et al. Human papillomavirus and cancerous diseases of the head and neck: a systematic review and meta-analysis. *Oral Dis*. 2015;21(4):417-31.
302. Rosenthal DI, Harari PM, Giralt J, Bell D, Raben D, Liu J, et al. Association of Human Papillomavirus and p16 Status With Outcomes in the IMCL-9815 Phase III Registration Trial for Patients With Locoregionally Advanced Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck Treated With Radiotherapy With or Without Cetuximab. *J Clin Oncol*. 2016;34(12):1300-8.
303. Rischin D, Young RJ, Fisher R, Fox SB, Le QT, Peters LJ, et al. Prognostic significance of p16INK4A and human papillomavirus in patients with oropharyngeal cancer treated on TROG 02.02 phase III trial. *J Clin Oncol*. 2010;28(27):4142-8.
304. Dalianis T, Grun N, Koch J, Vlastos A, Tertipis N, Nordfors C, et al. Human papillomavirus DNA and p16(INK4a) expression in hypopharyngeal cancer and in relation to clinical outcome, in Stockholm, Sweden. *Oral Oncol*. 2015;51(9):857-61.
305. Lassen P, Primdahl H, Johansen J, Kristensen CA, Andersen E, Andersen LJ, et al. Impact of HPV-associated p16-expression on radiotherapy outcome in advanced oropharynx and non-oropharynx cancer. *Radiother Oncol*. 2014;113(3):310-6.

306. Masterson L, Moualed D, Liu ZW, Howard JE, Dwivedi RC, Tysome JR, et al. De-escalation treatment protocols for human papillomavirus-associated oropharyngeal squamous cell carcinoma: a systematic review and meta-analysis of current clinical trials. *Eur J Cancer*. 2014;50(15):2636-48.
307. Lassen P, Eriksen JG, Hamilton-Dutoit S, Tramm T, Alsner J, Overgaard J. Effect of HPV-associated p16INK4A expression on response to radiotherapy and survival in squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Clin Oncol*. 2009;27(12):1992-8.
308. Brandsma JL, Abramson AL. Association of papillomavirus with cancers of the head and neck. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 1989 May;115(5):621-5. PMID: 2539843
309. Rihkanen H, Peltomaa J, Syrjänen S. Prevalence of human papillomavirus (HPV) DNA in vocal cords without laryngeal papillomas. *Acta oto-laryngologica*. 1994;114(3):348-51.
310. Smith EM, Summersgill KF, Allen J, Hoffman HT, McCulloch T, Turek LP, et al. Human papillomavirus and risk of laryngeal cancer. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2000;109(11):1069-76.
311. François M. Papillomatose laryngée. *Encycl Méd Chir (Editions Scientifiques et Médicales Elsevier SAS, Paris, tous droits réservés), Oto-rhino-laryngologie*, 20-705-A-10, 2000, 8 p.
312. Bauman NM, Smith RJ. Recurrent respiratory papillomatosis. *Pediatr Clin North Am* 1996; 43 : 1385-1401.
313. Kawana K, Yasugi T, Yoshikawa H, Kawana Y, Matsumoto K, Nakagawa S, et al. Evidence for the presence of neutralizing antibodies against human papillomavirus type 6 in infants born to mothers with condyloma acuminata. *Am J Perinatol*. 2003;20(1):11-6.
314. Leung R, Hawkes M, Campisi P. Severity of juvenile onset recurrent respiratory papillomatosis is not associated with socioeconomic status in a setting of universal health care. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2007;71(6):965-72.
315. Hobbs CG, Sterne JA, Bailey M, Heyderman RS, Birchall MA, Thomas SJ. Human papillomavirus and head and neck cancer: a systematic review and meta-analysis. *Clin Otolaryngol*. 2006;31(4):259-66.
316. Baez A, Almodovar JI, Cantor A, Celestin F, Cruz-Cruz L, Fonseca S, et al. High frequency of HPV16-associated head and neck squamous cell carcinoma in the Puerto Rican population. *Head Neck*. 2004 Sep;26(9):778-84. PMID: 15350023
317. Rodrigo JP, Hermsen MA, Fresno MF, Brakenhoff RH, Garcia-Velasco F, Snijders PJ, et al. Prevalence of human papillomavirus in laryngeal and hypopharyngeal squamous cell carcinomas in northern Spain. *Cancer Epidemiol*. 2015;39(1):37-41.
318. Laco J, Slaninka I, Jirasek M, Celakovsky P, Vosmikova H, Ryska A. High-risk human papillomavirus infection and p16INK4a protein expression in laryngeal lesions. *Pathol Res Pract*. 2008;204(8):545-52. PMID: 18440161
319. Stasikowska-Kanicka O, Wagrowska-Danilewicz M, Danilewicz M. Effect of human papillomavirus on cell cycle-related proteins p16INK4A, p21waf1/cip1, p53 and cyclin D1 in sinonasal inverted papilloma and laryngeal carcinoma. An in situ hybridization study. *Folia Histochem Cytobiol*. 2011;49(1):34-40.
320. Lewis JS, Jr., Ukpo OC, Ma XJ, Flanagan JJ, Luo Y, Thorstad WL, et al. Transcriptionally-active high-risk human papillomavirus is rare in oral cavity and laryngeal/hypopharyngeal squamous cell carcinomas--a tissue microarray study utilizing E6/E7 mRNA in situ hybridization. *Histopathology*. 2012;60(6):982-91.
321. IARC - Global Cancer Observatory. Cancer Incidence in Five Continents. 2017 [Disponible en: <http://gco.iarc.fr/>].
322. Si-Mohamed A, Badoual C, Hans S, Pere H, Tartour E, Brasnu D. An unusual human papillomavirus type 82 detection in laryngeal squamous cell carcinoma: case report and review of literature. *J Clin Virol*. 2012;54(2):190-3.
323. Shaughnessy JN, Farghaly H, Wilson L, Redman R, Potts K, Bumpous J, et al. HPV: a factor in organ preservation for locally advanced larynx and hypopharynx cancer? *Am J Otolaryngol*. 2014 Jan-Feb;35(1):19-24. PMID: 24119488
324. Garden AS, Kies MS, Weber RS. To TORS or Not to TORS: but is that the question? Comment on "transoral robotic surgery for advanced oropharyngeal carcinoma". *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2010 Nov;136(11):1085-7. PMID: 21079161
325. Overgaard J, Hansen HS, Specht L, Overgaard M, Grau C, Andersen E, et al. Five compared with six fractions per week of conventional radiotherapy of squamous-cell carcinoma of head and neck: DAHANCA 6 and 7 randomised controlled trial. *Lancet*. 2003;362(9388):933-40.
326. Bourhis J, Overgaard J, Audry H, Ang KK, Saunders M, Bernier J, et al. Hyperfractionated or accelerated radiotherapy in head and neck cancer: a meta-analysis. *Lancet*. 2006;368(9538):843-54.
327. Fu KK, Pajak TF, Trotti A, Jones CU, Spencer SA, Phillips TL, et al. A Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) phase III randomized study to compare hyperfractionation and two variants of accelerated fractionation to standard fractionation radiotherapy for head and neck squamous cell carcinomas: first report of RTOG 9003. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2000;48(1):7-16.
328. Adelstein DJ, Ridge JA, Brizel DM, et al. Transoral resection of pharyngeal cancer: summary of a National Cancer Institute Head and Neck Cancer Steering Committee Clinical Trials Planning Meeting, 6–7 November 2011, Arlington, Virginia. *Head Neck*. 2012;34:1681–703.

329. Harper DM, Franco EL, Wheeler C, Ferris DG, Jenkins D, Schuind A, et al. Efficacy of a bivalent L1 virus-like particle vaccine in prevention of infection with human papillomavirus types 16 and 18 in young women: a randomised controlled trial. *Lancet*. 2004;364(9447):1757-65.
330. Schiller JT, Castellsague X, Garland SM. A review of clinical trials of human papillomavirus prophylactic vaccines. *Vaccine*. 2012;30 Suppl 5:F123-38.
331. Smith JF, Brownlow MK, Brown MJ, Esser MT, Ruiz W, Brown DR. Gardasil antibodies cross-neutralize pseudovirion infection of vaccine-related HPV types. 23rd International Papillomavirus Conference and Clinical Workshop Abstract PL 1-6, Prague, September 1-7 2006.
332. Wang JW, Hung CF, Huh WK, Trimble CL, Roden RB. Immunoprevention of human papillomavirus-associated malignancies. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2015;8(2):95-104.
333. Marty R, Roze S, Bresse X, Largeron N, Smith-Palmer J. Estimating the clinical benefits of vaccinating boys and girls against HPV-related diseases in Europe. *BMC Cancer*. 2013;13:10.
334. Bogaards JA, Wallinga J, Brakenhoff RH, Meijer CJ, Berkhof J. Direct benefit of vaccinating boys along with girls against oncogenic human papillomavirus: bayesian evidence synthesis. *BMJ*. 2015;350:h2016.
335. Jiang Y, Gauthier A, Postma MJ, Ribassin-Majed L, Largeron N, Bresse X. A critical review of cost-effectiveness analyses of vaccinating males against human papillomavirus. *Hum Vaccin Immunother*. 2013;9(11):2285-95.
336. Gildener-Leapman N, Lee J, Ferris RL. Tailored immunotherapy for HPV positive head and neck squamous cell cancer. *Oral Oncol*. 2014;50(9):780-4.
337. Gildener-Leapman N, Ferris RL, Bauman JE. Promising systemic immunotherapies in head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncol*. 2013;49(12):1089-96.
338. Quezada SA, Peggs KS. Exploiting CTLA-4, PD-1 and PD-L1 to reactivate the host immune response against cancer. *Br J Cancer*. 2013 Apr 30;108(8):1560-5. PMID: 23511566
339. Sewell DA, Pan ZK, Paterson Y. Listeria-based HPV-16 E7 vaccines limit autochthonous tumor growth in a transgenic mouse model for HPV-16 transformed tumors. *Vaccine*. 2008;26(41):5315-20.
340. Lyford-Pike S, Peng S, Young GD, Taube JM, Westra WH, Akpeng B, et al. Evidence for a role of the PD-1:PD-L1 pathway in immune resistance of HPV-associated head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res*. 2013;73(6):1733-41.
341. Modjtahedi H. Molecular therapy of head and neck cancer. *Cancer Metastasis Rev*. 2005;24(1):129-46.
342. Hong A, Dobbins T, Lee CS, Jones D, Jackson E, Clark J, et al. Relationships between epidermal growth factor receptor expression and human papillomavirus status as markers of prognosis in oropharyngeal cancer. *Eur J Cancer*. 2010;46(11):2088-96.
343. Seiwert T, Clement P, Cupissol D, et al. BIBW 2992 versus cetuximab in patients with metastatic or recurrent head and neck cancer (SCCHN) after failure of platinum-containing therapy with a crossover period for progressing patients: preliminary results of a randomized, open-label phase II study. *J Clin Oncol*. 2010;28(suppl 15): 5501.
344. Harrington K, Berrier A, Robinson M, et al. Randomised Phase II study of oral lapatinib combined with chemoradiotherapy in patients with advanced squamous cell carcinoma of the head and neck: rationale for future randomised trials in human papilloma virusnegative disease. *Eur J Cancer*. 2013;49:1609-1618.
345. Abdul Razak AR, Soulieres D, Laurie SA, et al. A phase II trial of dacomitinib, an oral pan-human EGF receptor (HER) inhibitor, as first-line treatment in recurrent and/or metastatic squamous-cell carcinoma of the head and neck. *Ann Oncol*. 2013;24:761-769.
346. Walker J, Smiley LC, Ingram D, et al. Expression of human papillomavirus type 16 E7 is sufficient to significantly increase expression of angiogenic factors but is not sufficient to induce endothelial cell migration. *Virology*. 2011;410(2): 283-90.
347. Takeuchi S, Takahashi A, Motoi N, Yoshimoto S, Tajima T, Yamakoshi K, et al. Intrinsic cooperation between p16INK4a and p21Waf1/Cip1 in the onset of cellular senescence and tumor suppression in vivo. *Cancer Res*. 2010;70(22):9381-90.
348. Bussu F, Sali M, Gallus R, Vellone VG, Zannoni GF, Autorino R, et al. HPV infection in squamous cell carcinomas arising from different mucosal sites of the head and neck region. Is p16 immunohistochemistry a reliable surrogate marker? *Br J Cancer*. 2013 Mar 19;108(5):1157-62. PMID: 23403821
349. Fischer CA, Zlobec I, Green E, Probst S, Storck C, Lugli A, et al. Is the improved prognosis of p16 positive oropharyngeal squamous cell carcinoma dependent of the treatment modality? *Int J Cancer*. 2010 Mar 1;126(5):1256-62. PMID: 19697324
350. Koo CL, Kok LF, Lee MY, Wu TS, Cheng YW, Hsu JD, et al. Scoring mechanisms of p16INK4a immunohistochemistry based on either independent nucleic stain or mixed cytoplasmic with nucleic expression can significantly signal to distinguish between endocervical and endometrial adenocarcinomas in a tissue microarray study. *J Transl Med*. 2009;7:25.
351. Smeets SJ, Hesselink AT, Speel EJ, Haesevoets A, Snijders PJ, Pawlita M, et al. A novel algorithm for reliable detection of human papillomavirus in paraffin embedded head and neck cancer specimen. *Int J Cancer*. 2007 Dec 1;121(11):2465-72. PMID: 17680565
352. Stephen JK, Divine G, Chen KM, Chitale D, Havard S, Worsham MJ. Significance of p16 in Site-specific HPV Positive and HPV Negative Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Cancer Clin Oncol*. 2013;2(1):51-61.

353. Wilson DD, Rahimi AS, Saylor DK, Stelow EB, Jameson MJ, Shonka DC, et al. p16 not a prognostic marker for hypopharyngeal squamous cell carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2012 Jun;138(6):556-61. PMID: 22710507
354. Clasificación Nacional de Actividades Económicas, en Wikipedia (https://es.wikipedia.org/wiki/Clasificaci%C3%B3n_Nacional_de_Actividades_Econ%C3%B3micas) [última actualización 30 dic 2016]
355. Laryngeal Mortality Rates by age in UK. <http://www.cancerresearchuk.org/health-professional/cancer-statistics/statistics-by-cancer-type/laryngeal-cancer#heading-One>.
356. Megwalu UC, Sikora AG. Survival outcomes in advanced laryngeal cancer. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg.* 2014;140(9):855-60.
357. Wong LY, Wei WI, Lam LK, Yuen AP. Salvage of recurrent head and neck squamous cell carcinoma after primary curative surgery. *Head Neck.* 2003 Nov;25(11):953-9. PMID: 14603456
358. Goodman SN, Berlin JA. The use of predicted confidence intervals when planning experiments and the misuse of power when interpreting results. *Ann Intern Med.* 1994 Aug 1;121(3):200-6. Erratum in: *Ann Intern Med* 1995 Mar 15;122(6):478. PubMed PMID: 8017747